

02-09247  
Planche 1

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

### PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

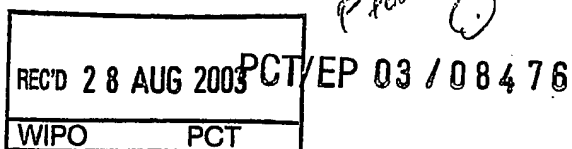
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
25 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



02.09.24  
P. B. 11.20.07  
①

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

**Important !** Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190500

<b>REMISE DES PIÈCES</b> <b>DATE</b> 19 JUIL 2002 <b>LIEU</b> 75 INPI PARIS B <b>N° D'ENREGISTREMENT</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI</b> 19 JUIL. 2002 <b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> FP-BFF020009		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> CABINET PLASSERAUD 84, rue d'Amsterdam 75440 PARIS CEDEX 09 FRANCE	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date / /
		N°	Date / /
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	Date / /
		N°	Date / /
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> AMPLIFICATION MULTIPLEX QUANTITATIVE A L'ECHELLE D'UN GENOME, ET APPLICATIONS A LA DETECTION DE REMANIEMENTS GENOMIQUES			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	101, rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 JUIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> <b>0209247</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 W / 180500	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		FP/BFF020009	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		PARIS	
Prénom		Fabienne	
Cabinet ou Société		CABINET PLASSERAUD	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		02-0302	
Adresse	Rue	84, rue d'Amsterdam	
	Code postal et ville	75009	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.44.63.41.11	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.42.80.01.59	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		paris@plass.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) PARIS Fabienne (n° 02-0302)		VICA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  L. MARIELLO	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 JUIN 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0209247</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		FP/BFF020009	
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/>	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/>	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/>	
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DE ROUEN	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		<input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/>	
Adresse	Rue	1, rue Thomas Becket	
	Code postal et ville	76821	MONT-SAINT-AIGNAN CEDEX
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/>	
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
PARIS Fabienne (n° 02-0302)		L. MARIELLO	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

**Amplification multiplex quantitative à l'échelle d'un génome, et applications à la détection de remaniements génomiques.**

5

**DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION :**

La présente invention est, de manière générale, relative à des moyens applicables à l'échelle d'un génome, tel que le génome humain, qui permettent d'amplifier  
10 des cibles nucléotidiques en multiplex en atteignant un niveau quantitatif de précision. Ces moyens trouvent notamment des applications dans le domaine de la détection de remaniements génomiques.

Plus particulièrement, la présente invention propose des rallonges d'amorces  
15 d'amplification qui permettent de produire des amorces composites spécialement adaptées à l'amplification multiplex quantitative à l'échelle du génome. La présente demande de brevet vise donc ces différents produits, ainsi que des méthodes et utilisations les mettant en oeuvre.

20 De manière remarquable, les moyens selon l'invention permettent non seulement de détecter des remaniements localisés au sein d'un ou plusieurs gènes, mais tout aussi bien des remaniements chromosomiques. En particulier, les moyens selon l'invention permettent de détecter des remaniements génomiques hétérozygotes qui ont entraîné une perte ou un gain de matériel génétique, c'est-à-dire des  
25 remaniements génomiques déséquilibrés.

De manière avantageuse, les moyens selon l'invention permettent de détecter des remaniements chromosomiques cryptiques (c'est-à-dire non détectables par les techniques du caryotype standard). Les moyens selon l'invention sont donc d'un  
30 grand intérêt pour le diagnostic des maladies géniques et chromosomiques, pour l'établissement de cartes de remaniements génomiques, et pour l'isolement de gènes impliqués dans une maladie génétique.

**ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE :**

Parmi les maladies génétiques, on distingue celles qui trouvent leur origine au niveau des anomalies d'un ou de plusieurs gènes (maladies géniques), et celles qui  
5 trouvent leur origine au niveau du chromosome (maladies chromosomiques).

Les maladies monogéniques, telles que les myopathies, la mucoviscidose, ont pour origine des anomalies à l'intérieur de la séquence d'un, voire plusieurs gènes : il peut par exemple s'agir de mutations ponctuelles, ou bien encore de  
10 duplications ou de délétions d'exons.

Les maladies chromosomiques résultent quant à elles d'anomalies constitutionnelles du nombre ou de la structure des chromosomes. De telles anomalies peuvent, par exemple, survenir lors de la méiose à partir de concepteurs sains, ou être déjà présentes chez l'un des deux parents.

15 Les anomalies de nombre se caractérisent par l'excès ou l'absence d'un ou plusieurs chromosomes complets dans la cellule. Ainsi, lorsque le caryotype présente 47 chromosomes, il s'agit généralement d'une trisomie, la plus connue étant la trisomie 21.

20 Les anomalies de structure chromosomique résultent de cassures chromosomiques suivies de recollements anormaux. Leur occurrence est le plus généralement familiale, avec une fréquence relativement élevée dans la population générale (2,4 pour 1000).

Quand le remaniement de structure ne s'accompagne ni de perte ni de gain de matériel génétique, il est dit équilibré, et reste le plus souvent silencieux, sans  
25 expression phénotypique. C'est le cas, par exemple des translocations dites Robertsoniennes. Dans le cas contraire, il est dit déséquilibré et il s'exprime alors généralement sous la forme d'une stérilité ou d'avortements spontanés, s'il est létal, et sous la forme de syndromes associant polymalformations et retard mental  
30 (SPRM), tels que le Syndrome de DiGeorge, quand ce déséquilibre est viable. C'est le cas, par exemple, des remaniements chromosomiques par délétion ou insertion.

Détection de remaniements géniques :

Pour détecter l'éventuelle présence d'un remaniement génique, tel qu'une délétion ou une duplication exonique, on a souvent utilisé la méthode classique dite de Southern qui consiste en une hybridation sur l'ADN génomique, coupé par des enzymes de restriction, d'une sonde nucléotidique spécifique de la région touchée par le remaniement génique considéré.

A cause de la complexité et de l'imprécision de cette méthode traditionnelle, plusieurs méthodes faisant appel à la PCR ont été développées. Les méthodes basées sur la PCR multiplex sont bien adaptées à la détection rapide d'un éventuel remaniement génique. On peut, par exemple, trouver la description d'une méthode PCR multiplex pour la détection de délétions et duplications exoniques dans l'article Duponchel *et al.* 2001 (*Human Mutation* 17 : 61-70 « *Rapid detection by fluorescent multiplex PCR of exons deletions and duplications in the C1 inhibitor gene of hereditary angioedema patients* »), et l'article Charbonnier *et al.* 2000 (*Cancer Research* 60 : 2760-2763 « *Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments* »).

L'article Duponchel *et al.* 2001 (*Human Mutation* 17 : 61-70) décrit une méthode basée sur la PCR multiplex fluorescente (marquage direct ou indirect) qui permet la détection de délétions et duplications exoniques hétérozygotes au sein d'un gène de petite taille, à savoir le gène *C1 inhibiteur*. Selon cette méthode, deux rallonges particulières différentes, constituée chacune de 16 nucléotides, sont ajoutées à l'extrémité 5' des amorces sens et des amorces antisens, respectivement. Ces rallonges de 16 nucléotides sont présentées comme formant une séquence rare. Ces rallonges sont adaptées à la détection de remaniements géniques, mais ne sont pas adaptées à la détection fiable de remaniements chromosomiques tels que les remaniements chromosomiques cryptiques, de sorte qu'elles ne constituent pas une solution à ce problème technique particulier.



On trouve aussi dans l'article Charbonnier *et al.* 2000 (Cancer Research 60 : 2760-2763) la description d'une méthode PCR multiplex pour la détection de délétions et duplications exoniques au sein des gènes de réparation *MLH1* et *MSH2* (cancer colorectal non polyposique héréditaire, ou syndrome HNPCC).

5 Cette méthode de PCR multiplex repose sur le ciblage de courts fragments exoniques (de 92 à 288 pb), et utilise à cette fin des amorces sans rallonge ou avec le dinucléotide « GG » qui sépare le fluorochrome de la séquence d'hybridation sur les amorces marquées. De telles amorces ne sont pas adaptées à une exploration à l'échelle de tout un génome, mais simplement à l'échelle des

10 quelques gènes visés. Elles ne répondent donc elles non plus pas au problème technique résolu par l'invention.

L'utilisation de rallonges dites universelles dans le cadre d'une PCR multiplex est également décrite dans la demande de brevet WO 99/58721 au nom du Whitehead

15 Institute for Biomedical Research (Inv. David G. Lang et Eric S. Lander ; « *Multiplex DNA amplification using chimeric primers* »). La méthode PCR multiplex décrite dans la demande WO 99/58721 est destinée à résoudre le problème du génotypage par amplification simultanée de nombreux microsatellites ou SNPs (« *Single Nucleotide Polymorphisms* »).

20 Pour amplifier simultanément plusieurs séquences cibles, la méthode divulguée dans la demande WO 99/58721 comprend une réaction d'amplification qui est menée sur l'ADN à l'aide d'amorces chimériques en présence de fortes concentrations de magnésium (2,5 à 7,0 millimolaires), et sous de faibles

25 températures d'élongation (60-70°C). Cette réaction d'amplification peut être accompagnée d'un marquage direct (par exemple à l'aide de biotine), ou bien être suivie d'une deuxième réaction d'amplification qui vient placer le marquage sur les produits d'amplification de la première réaction (marquage indirect).

30 Les amorces chimériques divulguées pour la réaction d'amplification sur l'ADN sont chacune constituées d'un segment d'hybridation qui reconnaît sa cible sur l'ADN, et d'une rallonge constante qui devrait avoir une faible tendance à s'hybrider à l'ADN. Selon la méthode divulguée, la séquence de la partie

constante est choisie parmi les séquences de bactériophages, d'insectes ou de reptiles, lorsque l'ADN provient d'un mammifère (et *vice versa*), car ces différences d'espèce seraient suffisantes à réduire la propension du fragment constant à hybrider sur l'ADN. Une paire de fragments constants constitués  
5 chacun de 23 nucléotides y est explicitement décrite (référéncés sous SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 dans WO 99/58721). Ces deux rallonges constantes sont issues des promoteurs des bactériophages T7 et T3, respectivement.

Toutefois, il est facilement vérifiable, par exemple par analyse informatique de  
10 l'hybridation de ces séquences de bactériophages sur le génome humain, que le choix de rallonges constantes parmi les séquences d'une espèce éloignée dans l'évolution ne représente pas un critère fiable pour réduire la propension de ces rallonges à s'hybrider à l'ADN.

La solution technique divulguée dans la demande WO 99/58721 résout donc le  
15 problème qualitatif du génotypage simultané d'un grand nombre de microsatellites ou de SNPs, mais ne peut pas répondre au problème de la réalisation de PCR multiplex quantitatives telles que celles qui sont nécessaires pour la détection fiable de remaniements chromosomiques, et notamment de remaniements chromosomiques cryptiques.

20

Le brevet US 6,207,372 au nom de Antony P. Shuber (cessionnaire Genzyme Corp. ; « *Universal Primer Sequence for multiplex DNA amplification* ») décrit une méthode PCR multiplex qui utilise des amorces dites universelles décrites comme permettant d'homogénéiser les cinétiques d'hybridation. Ces amorces  
25 universelles comprennent une séquence qui s'hybride à l'ADN cible, et une rallonge (« *UPS tag* ») de 17 à 25 bases. Cette rallonge est non-apparentée à l'ADN cible, riche en GC à son extrémité 5', et a la propriété de former des hybrides stables avec la séquence qui lui est complémentaire, caractérisés par une température de fusion supérieure à 60°C. La séquence présentée comme préférée  
30 pour servir de rallonge universelle est un 20-mer dérivé du bactériophage M13mp8. De telles rallonges sont adaptées à des applications qualitatives de la PCR multiplex, par exemple à la détection de mutations connues par coupure avec enzymes de restriction ou de mutations inconnues par SSCP (« *Single-Strand*

*Conformational Polymorphism* »), mais ne répondent pas au problème de la PCR multiplex quantitative.

A la connaissance de la Demanderesse, aucune des méthodes PCR multiplex  
5 décrites dans l'art antérieur comme étant adaptées à la détection de remaniements  
géniques particuliers ne permet donc d'accéder à un niveau quantitatif de  
précision, et plus particulièrement à un niveau quantitatif de précision à l'échelle  
d'un génome, tel que le génome humain. Aucune de ces méthodes n'est  
transposable à la détection de remaniements chromosomiques, tels que les  
10 remaniements chromosomiques cryptiques.

#### Détection de remaniements chromosomiques :

Pour ce qui concerne la détection de remaniements chromosomiques, les  
15 techniques du caryotype standard sont encore couramment utilisées pour le  
diagnostic de tels remaniements. Le caryotype s'est toutefois révélé insuffisant  
pour la détection de certains remaniements chromosomiques, et notamment pour  
la détection de remaniements chromosomiques sub-télomériques. D'autres  
méthodes, mieux adaptées à la détection des remaniements chromosomiques  
20 cryptiques (c'est-à-dire non détectables par les techniques du caryotype standard),  
ont donc été développées.

La FISH (« *Fluorescence In Situ Hybridization* ») dite « tout télomère » basée sur  
l'utilisation de 62 sondes commercialisées juxta-télomériques, est la méthode  
25 actuellement la plus utilisée (Knight S. J. L. *et al.* 1999, Lancet 354 : 1676-1681 "  
*Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental  
retardation* " ; Knight S. J. L. and Flint J. 2000, J. Med. Genet. 37:401-409 "  
*Perfect endings : a review of subtelomeric probes and their use in clinical  
diagnosis*"). L'utilisation de cette méthode en routine est toutefois limitée par les  
30 exigences en terme de qualité d'échantillon (bon index mitotique, et métaphases  
de bonne qualité), le coût élevé des réactifs et le temps nécessaire à  
l'interprétation des résultats.

La CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) a également été utilisée pour la détection des remaniements chromosomiques cryptiques (Breen C. J. *et al.* 1999, J. Med. Genet. 36 : 511-517 « *Applications of comparative genomic hybridization in constitutional chromosome studies* » ; Ghaffari S. R. *et al.* 1998, J. Med. Genet. 35 : 225-233 « *A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation* »). Mais son interprétation reste délicate, en particulier au niveau des télomères, du fait de la décroissance progressive de la fluorescence vers les extrémités. De plus, la CGH a une résolution comprise entre 5 et 10 Mégabases, donc inférieure à celle de la FISH, une mauvaise reproductibilité, et nécessite un matériel de coût élevé.

La méthode CGH a été combinée plus récemment avec l'utilisation de la technologie des puces d'ADN (Pinkel *et al.*, 1998, Nature Genetics 20, 207-211 « *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays* », Snijders AM *et al.*, 2001, Nature Genetics 29, 263-264 « *Assembly of Microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number* »). Cette méthode combinant CGH et puces à ADN repose sur l'utilisation d'un très grand nombre de clones d'ADN génomique immobilisés sur des lames de verre. Elle est décrite comme permettant d'atteindre des résolutions inférieures à 1 Mb.

L'étude de la ségrégation des microsatellites au sein d'une famille permet la détection indirecte de remaniements chromosomiques cryptiques en mettant en évidence une ségrégation anormale des allèles parentaux (délétion ou duplication d'allèle chez l'enfant). Cette méthode nécessite néanmoins absolument de disposer des ADN parentaux, et est limitée par l'informativité des marqueurs.

Plus récemment, une méthode appelée MAPH (« *Multiple Amplifiable Probe Hybridization* ») a été utilisée pour détecter les délétions et duplications de gènes (Armour *et al.* 2000 Nucleic Acids Research 28(2) : 605-609 « *Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes* » ; demande WO 00/53804, au nom de The University of Nottingham « *Genetic screening* »). La MAPH est une méthode qui combine l'hybridation de sondes spécifiques sur l'ADN génomique immobilisé sur une membrane et la détection par PCR des

sondes effectivement hybridées, parvenant ainsi à un niveau quantitatif de précision. Le principe de la MAPH consiste à immobiliser sur filtre l'ADN à analyser, puis à le placer en hybridation avec un mélange de sondes spécifiques qui chacune portent à une de leurs extrémités les mêmes séquences constantes.

- 5 Ces séquences constantes ont pour fonction de permettre de n'utiliser qu'une seule et même paire d'amorces pour détecter par PCR les différentes sondes retenues par hybridation sur le filtre.

Actuellement, il n'existe donc pas, à la connaissance de la Demanderesse, de  
10 méthode qui résolve le problème de la détection de remaniements chromosomiques à l'aide d'une PCR multiplex. En effet, pour résoudre ce problème, il faut pouvoir conserver un niveau quantitatif de précision, tout en passant à l'échelle d'une région chromosomique, d'un chromosome, voire d'un  
15 génome entier tel que le génome humain. Or, la multiplicité des cibles qui doivent être visées pour détecter des remaniements chromosomiques et la variabilité du contexte de séquence dans lequel les différentes cibles génomiques peuvent se trouver compliquent considérablement le problème de l'obtention de cinétiques  
d'amplification homogènes pour les différentes cibles au sein de la même PCR multiplex.

20

En effet, pour amplifier simultanément les différentes cibles, les différentes paires d'amorces, dont le nombre est souvent supérieur à dix, sont placées toutes ensemble et en même temps sous les mêmes conditions opératoires (composition de milieu, températures, durées), c'est-à-dire sous des conditions opératoires  
25 unitaires qui ne correspondent généralement pas aux conditions optimales d'amorçage de chacune des paires d'amorces. Les cinétiques d'hybridation de chaque paire d'amorce étant différentes les unes des autres, cela conduit à une représentation non quantitative des différents fragments dans le produit final d'amplification, ou à l'apparition d'amplifications non spécifiques.

30

En outre, les interactions moléculaires à gérer sont nombreuses. D'une part, des interactions moléculaires peuvent survenir au niveau des amorces de PCR elles-mêmes par le biais de phénomènes de compétitions entre amorces, tels que des

phénomènes de dimérisation au sein d'une seule amorce, ou au sein de différentes combinaisons d'amorces. D'autre part, des interactions peuvent survenir au niveau des cibles amplifiées. La composition nucléotidique des cibles amplifiées peut en effet engendrer plusieurs types d'interactions : la formation de structures secondaires intra-moléculaires, et la formation de complexes inter-moléculaires entre différents amplicons. Le résultat global correspond alors au mieux à une PCR multiplex qualitative.

Aucune méthode PCR multiplex de l'art antérieur ne permettait donc d'accéder à un niveau quantitatif de précision, tout en gardant une totale flexibilité concernant le panel de régions génomiques analysables, condition nécessaire pour les applications d'une telle méthode à l'échelle du génome. Plus particulièrement, aucune amplification multiplex n'a été antérieurement développée pour la détection des remaniements chromosomiques cryptiques.

Il subsistait donc un besoin pour une méthode d'amplification multiplex de type PCR multiplex qui serait aisée à mettre en œuvre, applicable à l'échelle d'un génome tel que le génome humain, tout en restant flexible, et qui permettrait d'accéder à la détection non seulement de remaniements géniques, mais aussi et surtout de remaniements chromosomiques, et plus particulièrement de remaniements chromosomiques cryptiques tels que les remaniements sub-télomériques, et cela à un niveau quantitatif de précision.

#### **DESCRIPTION SYNTHETIQUE DE L'INVENTION :**

La présente demande propose une solution technique qui ne présente pas les inconvénients des techniques de l'art antérieur, et qui présente l'avantage de permettre d'amplifier en multiplex plusieurs cibles nucléotidiques de façon quantitative, tout en étant applicable à l'échelle d'un génome, tel que le génome humain.

Les inventeurs ont en effet réussi à mettre au point des amorces composites, chacune formées d'un segment d'hybridation et d'une rallonge, qui permettent

d'atteindre cet objectif. Pour ce faire, les inventeurs ont fait le choix et sont parvenus à construire des amorces composites telles qu'aucun appariement stable ne se forme entre amorces composites lors des amplifications multiplex.

5 Un aspect de l'invention réside dans la construction de rallonges particulières, appropriées à l'objectif poursuivi et aux choix techniques fixés par les inventeurs. Les inventeurs ont en effet choisi et réussi à produire des rallonges qui sont suffisamment longues pour homogénéiser l'écart de températures de fusion ( $T_m$ )  
10 étant suffisamment courtes pour que ces rallonges ne forment aucun appariement stable lors de l'amplification multiplex. Les rallonges selon l'invention ont chacune une séquence nucléotidique :

- qui est absente ou rare dans l'acide nucléique ou le mélange d'acides nucléiques sur lequel va être appliquée l'amplification multiplex, et
- 15 - qui est en outre telle que les interactions moléculaires qu'elles peuvent éventuellement former lors d'une amplification multiplex sont peu stables.

Avantageusement, les rallonges selon l'invention permettent d'obtenir des résultats d'amplifications multiplex de précision quantitative. Elles sont en outre  
20 relativement courtes par rapport aux rallonges utilisées dans l'art antérieur, ce qui constitue un avantage technique important car, de ce fait, les amorces qui les contiennent peuvent être aisément synthétisées sous forme marquée.

De manière remarquable, les inventeurs sont parvenus à construire des rallonges de ce type qui sont applicables à l'échelle d'un génome entier, tel que le génome  
25 humain.

Ces rallonges nucléotidiques sont destinées à être ajoutées à l'extrémité 5' du segment d'hybridation, lequel est lui aussi sélectionné de manière à ne pas introduire d'interactions stables entre amorces composites.

30 Les amorces composites résultantes permettent alors d'obtenir facilement des cinétiques d'hybridation homogènes pour les différentes cibles qui sont amplifiées en multiplex.

L'invention propose également des conditions opératoires préférentielles pour ces amorces composites, afin d'obtenir aisément des amplifications quantitatives reproductibles. Ces conditions opératoires préférentielles comprennent notamment l'utilisation, dans le mélange réactionnel, d'un agent qui facilite la séparation des  
5 brins d'ADN tel que le triéthylammonium acétate (TEAA), le diméthylsulfoxyde (DMSO), cf. exemple 1.

Les amorces composites selon l'invention sont particulièrement bien adaptées à la mise en œuvre d'une amplification de type QMPSF (« *Quantitative Multiplex*  
10 *PCR of Short Fluorescent fragments* »). Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, on choisit ainsi un ensemble de cibles courtes (dont la taille est comprise entre 90 et 500 pb, de préférence entre 90 et 350 pb, plus préférentiellement entre 90 et 300 pb).

15 En sus de l'obtention d'un niveau quantitatif de précision alors même que plus d'une dizaine de cibles sont amplifiées en multiplex, la solution technique selon l'invention présente l'avantage d'une grande flexibilité pour l'inclusion de nouvelles régions cibles dans une amplification multiplex, et elle facilite profondément les étapes d'optimisation des paramètres opératoires  
20 d'amplification (détermination du nombre optimal de cycles d'amplification et de la température optimale d'hybridation, détermination des concentrations optimales pour les différentes amorces).

En terme d'applications, l'amplification multiplex quantitative selon l'invention,  
25 qui permet la détection de remaniements géniques tout comme de remaniements chromosomiques, présente l'avantage particulier de permettre la détection de remaniements chromosomiques cryptiques (cf. exemple 1). Elle permet également d'identifier et d'isoler des gènes impliqués dans des maladies génétiques (cf. exemple 2).



**DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION :**

Pour tout acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques à partir duquel on souhaite amplifier au moins une séquence nucléotidique cible, et notamment  
5 plusieurs séquences nucléotidiques cibles en multiplex et à un niveau quantitatif de précision, la présente invention fournit :

- une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à cette fin, chacune desdites amorces composites comprenant un segment d'hybridation et une rallonge nucléotidique, et des  
10 procédés permettant de produire une telle pluralité de paires d'amorces composites, ainsi que

- une paire de rallonges nucléotidiques qui conviennent, pour l'une, à une utilisation en tant que rallonge dans une amorce composite sens d'une telle pluralité, et, pour l'autre, à une utilisation en tant que rallonge dans une amorce  
15 antisens d'une telle pluralité, et des procédés permettant de produire une telle paire de rallonges.

La présente demande de brevet vise donc non seulement de telles paires de rallonges et de telles pluralités de paires d'amorces composites, mais également, individuellement en tant que produits, toute rallonge choisie au sein d'une paire  
20 de rallonges selon l'invention, ainsi que toute paire d'amorces composites et toute amorce composite qui sont choisies au sein d'une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention.

La présente demande de brevet vise également les applications biotechnologiques, médicales et vétérinaires de ces produits, notamment en terme de détection de  
25 remaniements génomiques, et plus particulièrement de remaniements chromosomiques.

Plus particulièrement, la présente demande de brevet vise chacun des objets définis dans les revendications telles que déposées.

30 Selon un premier aspect de l'invention, la présente demande vise un procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange

d'acides nucléiques, selon lequel chacune desdites amorces composites sens ou antisens produite est constituée :

- d'un segment d'hybridation, respectivement sens ou antisens, qui s'apparie audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, de manière à  
5 constituer une amorce sens ou antisens pour une des séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée, et
- d'une rallonge nucléotidique qui est liée à l'extrémité 5' dudit segment d'hybridation, mais qui ne s'apparie pas audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques,
- 10 - et éventuellement d'un composant non nucléotidique.

Le procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces selon l'invention est caractérisé en ce que les amorces composites sens et antisens de ladite pluralité de paires produite présentent des séquences respectives telles que :

- a) chaque amorce composite sens a, au sein de ladite pluralité, une amorce  
15 composite antisens avec laquelle elle forme une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments d'hybridation respectifs constituent, l'un par rapport à l'autre, une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, chacune desdites séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée ayant ainsi une paire d'amorces composites sens et antisens qui est  
20 destinée à son amplification,
- b) toutes les amorces composites sens contiennent la même rallonge nucléotidique, et toutes les amorces composites antisens contiennent la même rallonge nucléotidique, la rallonge des amorces composites sens étant différente de celle des amorces composites antisens,
- 25 c) la séquence de la rallonge des amorces composites sens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois inférieure) à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et la séquence de la rallonge des amorces composites  
30 antisens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois inférieure) à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille,

d) la température de fusion de chaque amorce composite (qu'elle soit sens ou antisens) est d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation nu sans rallonge,

e) chaque amorce composite de ladite pluralité de paires a une séquence  
 5 telle qu'aucune amorce composite de ladite pluralité de paires ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite de la même pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol, ladite variation d'énergie libre  $\Delta G$  étant calculée à l'aide du logiciel  
 10 « *Primer Premier* » version 5.0 commercialisé par PREMIER Biosoft International.

La présente demande de brevet vise ainsi toute pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens susceptible d'être obtenue par le procédé selon  
 15 l'invention. Une telle pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens est spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques.

20 La présente demande de brevet vise ainsi toute pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, chacune desdites amorces composites sens ou antisens étant constituée :

25 - d'un segment d'hybridation, respectivement sens ou antisens, qui s'apparie audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, de manière à constituer une amorce sens ou antisens pour une des séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée, et

- d'une rallonge nucléotidique qui est liée à l'extrémité 5' dudit segment  
 30 d'hybridation, mais qui ne s'apparie pas audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques,

- et éventuellement d'un composant non nucléotidique,  
 caractérisée en ce que :

a) chaque amorce composite sens a, au sein de ladite pluralité, une amorce composite antisens avec laquelle elle forme une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments d'hybridation respectifs constituent, l'un par rapport à l'autre, une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, chacune desdites séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée ayant ainsi une paire d'amorces composites sens et antisens qui est destinée à son amplification,

b) toutes les amorces composites sens contiennent la même rallonge nucléotidique, et toutes les amorces composites antisens contiennent la même rallonge nucléotidique, la rallonge des amorces composites sens étant différente de celle des amorces composites antisens,

c) la séquence de la rallonge des amorces composites sens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois inférieure) à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et la séquence de la rallonge des amorces composites antisens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois inférieure) à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille,

d) la température de fusion de chaque amorce composite (qu'elle soit sens ou antisens) est d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation sans rallonge,

e) chaque amorce composite de ladite pluralité de paires a une séquence telle qu'aucune amorce composite de ladite pluralité de paires ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite de la même pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol, ladite variation d'énergie libre  $\Delta G$  étant calculée à l'aide du logiciel « *Primer Premier* » version 5.0 commercialisé par PREMIER Biosoft International.

L'étape c) traduit le fait que les rallonges utilisées dans les amorces composites conformes à l'invention doivent être absentes ou rares du matériel nucléotidique sur lequel va être appliquée l'amplification multiplex.

- 5 Les étapes b), c), d) et e) traduisent le fait que les rallonges doivent être suffisamment longues pour homogénéiser les températures de fusion des différents segments d'hybridation (réduction du  $\Delta T_m$  des amorces composites), tout en restant suffisamment courtes pour ne pas introduire d'interactions stables entre amorces composites. Ceci permet en outre de renforcer la spécificité des amorces composites résultantes.
- 10

Il est également à noter que les caractéristiques des rallonges nucléotidiques selon l'invention (notamment la faible stabilité d'interaction) diffèrent radicalement de celles qui ont été proposée précédemment pour des rallonges utilisées en PCR multiplex qualitative, car la grande taille et la composition des rallonges proposées pour la PCR multiplex qualitative les rendaient nécessairement très stables dans leurs appariements.

15

- L'étape e) traduit le fait que, grâce à ces rallonges particulières, les amorces composites résultantes ne forment, au sein d'une même pluralité, aucun appariement stable. Le terme « stabilité » utilisé dans la présente demande en relation avec l'éventuel duplex que peut former, par appariement de bases, un oligonucléotide tel qu'une rallonge, un segment d'hybridation ou une amorce composite est entendu selon le sens et la portée que lui donne l'homme du métier.
- 20
- Il revêt ainsi un sens et une portée moléculaire et thermodynamique, qui peuvent être définis par le paramètre  $\Delta G$  de variation d'énergie libre liée à la formation d'un éventuel appariement. La stabilité d'un duplex oligonucléotidique est en effet déterminée d'après la formule générale  $\Delta G = G_{\text{produit}} - G_{\text{réactifs}}$ , qui permet de calculer le changement d'énergie libre produit par cette réaction chimique. Les valeurs de  $\Delta G$ , qui définissent la stabilité d'un appariement entre nucléotides, sont le plus souvent négatives, ce qui indique que les réactions entre oligonucléotides procèdent spontanément dans le sens « réactifs (oligonucléotides séparés)  $\Rightarrow$  produit (duplex partiel ou total) », toute réaction chimique ayant lieu spontanément
- 25
- 30

dans le sens d'une diminution de l'énergie libre. Il est néanmoins plus aisé de comparer les stabilités de différents appariements d'oligonucléotides en ne considérant que les valeurs absolues de  $\Delta G$ , une valeur absolue  $|\Delta G|$  élevée exprimant une stabilité élevée, et une valeur  $|\Delta G|$  faible exprimant une stabilité faible.

Sauf indication contraire, toutes les valeurs de  $\Delta G$  indiquées dans la présente demande ont été obtenues à l'aide de la version 5.0 du logiciel commercialisé sous la marque « *Primer Premier* ». Ce logiciel est disponible auprès de la société  
 10 PREMIER Biosoft International, 3786 Corina Way, Palo Alto, CA 94303-4504, U.S.A. (<http://www.premierbiosoft.com>). Il existe en effet dans le commerce des logiciels qui, à partir de la donnée de deux séquences, calculent la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation d'un éventuel appariement entre ces deux séquences. Le logiciel « *Primer Premier* » en est un exemple. Il suit le procédé  
 15 décrit par Breslauer KJ *et al.* 1986 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Juin 1986, Vol. 83, pp. 3746-3750, « *Predicting DNA duplex stability from the base sequence* »).  
 Brièvement, le procédé décrit par Breslauer KJ *et al.* 1986 suit le calcul suivant :

$$\Delta G = -(\Delta g_i + \Delta g_{\text{sym}}) + \sum_x \Delta g_x$$

avec :

20  $\Delta g_i$  étant égal à 5 kcal pour les duplex contenant des paires de bases G · C, et étant égal à 6 kcal pour les duplex composés exclusivement de paires de bases A · T,

$\Delta g_{\text{sym}}$  étant égal à 0,4 kcal pour les duplex formés à partir d'une séquence auto-complémentaire, et étant égal à 0 kcal pour les duplex formés à partir de  
 25 deux séquences complémentaires,

$\sum_x \Delta g_x$  étant égal à la somme des stabilités relatives de chaque interaction connue sous le nom de « interaction de proche voisinage » que l'on peut observer entre les deux brins du duplex (« *nearest-neighbor interactions* »), en suivant les valeurs de  $\Delta g_x$  suivantes :

Interaction de proche voisinage	$\Delta g_x$ (en kcal/mol)
AA/TT	1,9
AT/TA	1,5
TA/AT	0,9
CA/GT	1,9
GT/CA	1,3
CT/GA	1,6
GA/CT	1,6
CG/GC	3,6
GC/CG	3,1
GG/CC	3,1

Les interactions connues sous le nom d'interactions de proche voisinage (« *nearest-neighbor interactions* ») correspondent aux interactions qui résultent de la présence sur un brin du duplex d'une paire de bases qui est complémentaire de la paire de bases qui lui correspond sur l'autre brin du duplex. Ainsi, pour les duplex d'ADN, dix types d'interactions de proche voisinage sont possibles : dAA/dTT, dAT/dAT, dCG/dCG, dCT/dAG, dGA/dTC, dGC/dGC, dGG/dCC, dGT/dAC, dTA/dTA et dTG/dCA. Pour chacune de ces interactions de proche voisinage que l'on identifie dans le duplex, on affecte la valeur de stabilité relative  $\Delta g_x$  qui lui correspond, la somme de toutes ces stabilités relatives donnant la valeur  $\Sigma_x \Delta g_x$ . Cette somme de stabilités relatives est ensuite pondérée par les valeurs des paramètres  $\Delta g_i$  et  $\Delta g_{sym}$ , comme ci-dessus indiqué.

Dans la présente demande, les termes tels que « oligonucléotide », « amplification », « amorce » revêtent les significations usuelles qui leur sont données dans le domaine de la biologie moléculaire en général, et des réactions d'amplifications en chaîne par enzyme de type polymérase, en particulier.

Brièvement, le terme « oligonucléotide » implique usuellement un enchaînement de plus de deux nucléotides, préférentiellement de plus de trois nucléotides, jusqu'à une trentaine de nucléotides. Pour ce qui est des rallonges oligonucléotidiques selon l'invention, une taille comprise entre 8 et 18, 5 préférentiellement entre 8 et 14 nucléotides, bornes incluses s'est révélée appropriée pour une application au génome humain.

Le terme « amplification » fait référence à l'opération par laquelle le nombre de copies d'une séquence nucléotidique cible présente dans un échantillon se trouve 10 multiplié, c'est-à-dire, brièvement, un procédé qui utilise une enzyme à activité polymérasique et une amorce ou paire d'amorces pour augmenter la quantité d'une séquence nucléotidique particulière appelée cible, par polymérisation des quatre bases d'ATP, d'TTP, d'GTP et d'CTP, selon l'enchaînement nucléotidique de la séquence cible. L'enzyme la plus couramment utilisée pour ces procédés 15 d'amplification en chaîne est une polymérase (amplification par PCR), mais d'autres enzymes, par exemple une ligase, peuvent être utilisées.

La séquence nucléotidique cible est généralement contenue à l'intérieur d'un acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques (matrice nucléotidique), à partir duquel on cherche à l'amplifier. Dans certains cas, toutefois, la séquence 20 nucléotidique cible et la matrice nucléotidique ne sont qu'une seule et même entité.

Dans la pratique, l'amplification est généralement réalisée par une succession de cycles de hybridations-élongations-dénaturations, et les produits issus d'un cycle d'amplification servent alors de matrice au cycle suivant.

25

Le terme « amorce » ou « amorce d'amplification » fait référence à un oligonucléotide qui est capable d'agir comme un point d'initiation de la synthèse de manière à synthétiser un produit d'extension qui comprend la séquence nucléotidique cible visée, c'est-à-dire un oligonucléotide dont la séquence est telle 30 que cet oligonucléotide s'hybride sur la cible qui doit être amplifiée, ou sur l'éventuel acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques dans lequel cette séquence nucléotidique cible est contenue, à un site tel et avec une affinité telle qu'il est possible de l'élonguer à l'aide d'une enzyme à activité polymérasique par



complémentarité avec la séquence sur laquelle il s'est hybridé, la répétition cycliques de telles hybridations-élongations-dénaturations conduisant à amplifier ladite cible selon une cinétique exponentielle.

Les amorces d'amplification doivent présenter une séquence suffisamment  
5 complémentaire avec l'acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques pour permettre à l'enzyme à activité polymérasique d'exercer son activité d'élongation. Pour que la réaction d'amplification soit spécifique de la cible visée, il est nécessaire que la (ou les) amorce(s) utilisée(s) ait(aient) une séquence parfaitement complémentaire de la séquence de la cible. Les amorces  
10 d'amplification sont généralement relativement courtes (de l'ordre de 15 à 30 nucléotides), mais peuvent présenter une plus grande longueur dans certaines conditions expérimentales. Elles sont le plus souvent utilisées par paires, chaque membre d'une même paire étant alors choisi de manière à ce qu'une fois hybridé sur l'acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ils forment ensemble les  
15 bornes de la cible.

Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut être de l'ADN, de l'ARN, de l'ADNc, isolé ou synthétisé. Cet acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut être apporté sous forme purifiée ou pure, ou bien sous forme non-  
20 purifiée, dans la mesure où il reste accessible aux segments d'hybridation qui doivent s'apparier avec lui. Il peut donc tout aussi bien s'agir d'un échantillon biologique ou microbiologique qui donne accès à son contenu nucléotidique de telle sorte qu'une amorce puisse s'y hybrider.

Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut être simple-brin ou  
25 double-brin (s'il est double-brin une étape de dénaturation sera prévue afin de permettre l'hybridation des segments contenus dans les amorces composites).

L'invention peut être mise en œuvre sur tout type d'acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques. En effet, à la connaissance des inventeurs, une pluralité de paires d'amorces composites conforme à la présente invention peut être produite  
30 pour tout organisme ou microorganisme dont le génome entier ou une partie significative du génome a, à ce jour, été séquencé.

Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut ainsi être issu de cellules animales, de cellules végétales, ou de tout autre organisme dont le génome est diploïde ou polyploïde.

Par exemple, ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut ainsi être  
5 issu d'un végétal tel que le maïs, le blé, le colza, le tabac, et tout autre végétal utilisé pour la transgénèse ou dont la variation du nombre des copies de certains gènes a un effet phénotypique important, par exemple en relation avec la croissance ou avec la résistance à des conditions particulières.

Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut également être issu  
10 d'un microorganisme, tel que levure, champignon.

Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut également être issu d'un animal invertébré tel que ver, insecte, arachnide, mollusque, ou d'un animal vertébré tel que poisson, reptile, oiseau, mammifère. Par exemple, l'animal mammifère peut être un rongeur (lapin, souris, rat, cochon d'inde, hamster, par  
15 exemple), un bovin (par exemple une vache), un ovin (un mouton, une chèvre, par exemple), un porc (par exemple un cochon). Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit animal est un mammifère, et préférentiellement un être humain. Selon un mode particulièrement avantageux de réalisation de l'invention, la séquence des rallonges des amorces composites selon l'invention  
20 est absente ou rare dans le génome humain.

La séquence du génome humain est la séquence consensus résultant de la collection de toutes les séquences réalisées sur du matériel génétique humain. Les caractéristiques générales de cette séquence sont décrites dans Lander *et al.* 2001 (Nature 2001, 409:860-921 « *Initial sequencing and analysis of the human genome* »). Cette séquence est disponible en ligne sur le site du National Center of  
25 Biological Information (NCBI) :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>.

La recherche des séquences rares dans le génome humain peut être réalisée à l'aide du programme informatique « *Basic Local Alignment Score Tools* »  
30 (BLAST) disponible en ligne sur le site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, en suivant les instructions qui y sont données pour la recherche de séquences courtes.

Lorsque l'on dispose de rallonges dont la séquence est absente ou rare du génome de l'espèce à laquelle appartient le matériel nucléotidique sur lequel va être appliquée l'amplification multiplex, par exemple des rallonges dont la séquence est rare ou absente du génome humain, on peut alors, à partir de ces rallonges, 5 produire des amorces composites conformes à l'invention, qui sont utilisables pour n'importe quelles cibles contenues dans le génome de l'espèce en question. Ceci est particulièrement avantageux en terme de gamme d'applicabilité. Comme il sera illustré ci-dessous, de telles rallonges, qui sont absentes ou rares du génome humain, sont fournies par la présente invention.

10

Avantageusement, ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques est issu de cellules de mammifères, et notamment de cellules humaines.

De manière remarquable, ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques 15 peut être de l'ADN génomique total. L'homme du métier connaît de l'art antérieur de nombreux protocoles pour extraire, à partir d'une source biologique, du matériel nucléotidique de manière générale (ADN ou ARN), et de l'ADN génomique en particulier (cf. Maniatis *et al.* "*Molecular Cloning : A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Les protocoles les 20 plus utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique total, et en particulier de l'ADN génomique total humain sont ceux basés sur la protéinase K et ceux utilisant des colonnes d'affinité pour l'ADN disponibles dans le commerce. Ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques peut donc correspondre à l'ADN génomique total de l'organisme ou microorganisme dont il est issu, et notamment 25 à de l'ADN génomique total humain.

Pour des applications à visée médicale, on choisira donc de préférence une rallonge dont l'enchaînement oligonucléotidique n'est pas représenté dans le génome humain ou n'y est que faiblement représenté. Pour des applications à 30 visée vétérinaire, on choisira une rallonge dont l'enchaînement oligonucléotidique n'est pas représenté dans le génome de l'animal considéré, ou n'y est que faiblement représenté.

Lorsque l'acide nucléique ou le mélange d'acides nucléiques est le génome humain, la présente invention démontre qu'il est possible de produire des rallonges conformes à l'invention dont la taille n'est que de 8 à 18 nucléotides, préférentiellement de 8 à 15 nucléotides, plus préférentiellement de 8 à 14, encore plus préférentiellement de 8 à 12 nucléotides, très préférentiellement de 10 nucléotides. Une rallonge courte, dont la taille se situe par exemple entre 8 et 14 nucléotides, permet, par rapport à une rallonge nucléotidique plus longue, de synthétiser des amorces composites de meilleure qualité, notamment lorsqu'un marqueur de type fluorochrome doit y être associé.

10

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la séquence de la rallonge des amorces composites sens, ainsi que celle de la rallonge des amorces composites antisens sont chacune constituées d'un enchaînement de 10 nucléotides dont la teneur en GC est comprise entre 20% et 60% (bornes incluses), préférentiellement entre 20% et 50% (bornes incluses), plus préférentiellement entre 35 et 45% bornes incluses, très préférentiellement une teneur en GC de 40%.

Très préférentiellement, la séquence de la rallonge des amorces composites sens, ainsi que celle de la rallonge des amorces composites antisens sont chacune constituées d'un enchaînement de 10 nucléotides tel que l'appariement complet avec l'enchaînement de 10 nucléotides qui constitue son complémentaire parfait présente une énergie libre de formation  $\Delta G$  qui ne dépasse pas 11 kcal/mol.

A titre illustratif, des rallonges de 10 nucléotides spécialement adaptées à l'analyse du génome humain sont proposées dans la présente demande, à savoir les rallonges de séquence CGT TAG ATA G (SEQ ID NO :1), de séquence GAT AGG GTT A (SEQ ID NO :2), et les séquences complémentaires de SEQ ID NO :1 et de SEQ ID NO :2 (respectivement : CTA TCT AAC G SEQ ID NO :47, et TAA CCC TAT C SEQ ID NO :48). La séquence SEQ ID NO :1 et sa complémentaire sont, de manière avantageuse, utilisées en tant que rallonge d'amorce sens, et la séquence SEQ ID NO :2 et sa complémentaire en tant que rallonge d'amorce antisens.

La présente demande de brevet vise donc plus particulièrement les paires de rallonges suivantes :

- les séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 respectivement,
- la séquence SEQ ID NO :1 et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO :48) respectivement,
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence SEQ ID NO :2 respectivement, et
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO :47) et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO :48) respectivement.

La présente demande de brevet vise ainsi toute pluralité d'amorces composites sens et antisens pour laquelle la rallonge des amorces composites sens ou/et celle des amorces composites antisens est/sont choisie/choisies parmi le groupe constitué par la séquence de SEQ ID NO :1, la séquence de SEQ ID NO :2, et leurs séquences complémentaires (SEQ ID NO :47 et SEQ ID NO :48, respectivement), ou bien pour laquelle la séquence de la rallonge des amorces composites sens et celle des amorces composites antisens forment une paire de séquences choisie parmi le groupe constitué par les paires de séquences suivantes :

- la séquence SEQ ID NO :1 et la séquence de SEQ ID NO :2,
- la séquence de SEQ ID NO :1 et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48),
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence SEQ ID NO :2,
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO :47) et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48).

La présente demande fournit aussi plusieurs exemples de paires de segments d'hybridation qui, lorsqu'ils sont associés à une rallonge conformément à l'invention, forment des amorces composites selon l'invention. On pourra ainsi

utiliser les séquences de :

- SEQ ID NO :3 et SEQ ID NO :4 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *PRODH*,

- SEQ ID NO :7 et SEQ ID NO :8 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *UFDIL*,
  - SEQ ID NO :9 et SEQ ID NO :10 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *ARVCF*,
  - 5       - SEQ ID NO :11 et SEQ ID NO :12 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *HSPOX2*,
  - SEQ ID NO :13 et SEQ ID NO :14 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *HIRA*,
  - 10       - SEQ ID NO :27 et SEQ ID NO :28 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un autre court fragment exonique situé sur le gène *PRODH*,
  - SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène
  - 15   *USP18*,
  - SEQ ID NO :31 et SEQ ID NO :32 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *DGSA*,
  - SEQ ID NO :33 et SEQ ID NO :34 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène
  - 20   *DGRC6*,
  - SEQ ID NO :35 et SEQ ID NO :36 comme segments d'hybridation sens et antisens, respectivement, d'un court fragment exonique situé sur le gène *DGCR2*.
- 25   En couplant la rallonge de SEQ ID NO :1 à chaque segment d'hybridation sens, et la rallonge de SEQ ID NO :2 à chaque segment d'hybridation antisens, on obtient les amorces composites sens et antisens de séquences respectives :
- SEQ ID NO :15 et SEQ ID NO :16 pour amplifier un court fragment sur le gène *PRODH*,
  - 30       - SEQ ID NO :19 et SEQ ID NO :20 pour amplifier un court fragment sur le gène *UFDIL*,
  - SEQ ID NO :21 et SEQ ID NO :22 pour amplifier un court fragment sur le gène *ARVCF*,

- SEQ ID NO :23 et SEQ ID NO :24 pour amplifier un court fragment sur le gène *HSPOX2*,
- SEQ ID NO :25 et SEQ ID NO :26 pour amplifier un court fragment sur le gène *HIRA*,
- 5       - SEQ ID NO :37 et SEQ ID NO :38 pour amplifier un autre court fragment sur le gène *PRODH*,
- SEQ ID NO :39 et SEQ ID NO :40 pour amplifier un court fragment sur le gène *USP18*,
- SEQ ID NO :41 et SEQ ID NO :42 pour amplifier un court fragment sur
- 10   le gène *DGSA*,
- SEQ ID NO :43 et SEQ ID NO :44 pour amplifier un court fragment sur le gène *DGRC6*,
- SEQ ID NO :45 et SEQ ID NO :46 pour amplifier un court fragment sur le gène *DGCR2*.

15

Ces amorces composites sont utiles à l'exploration de la région chromosomique 22q11 humaine. Comme illustré en exemples 1 et 2 ci-dessous, les paires d'amorces composites sens et antisens (SEQ ID NO :15 ; SEQ ID NO :16), (SEQ ID NO :19 ; SEQ ID NO :20), (SEQ ID NO :21 ; SEQ ID NO :22) et (SEQ ID NO :23 ; SEQ ID NO :24) ont permis une amplification multiplex quantitative de leurs cibles, et cela à partir de l'ADN génomique humain total. Cette pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention a ainsi permis de déterminer les bornes de la délétion qui est observée dans la région chromosomique 22q11 dans le cadre du Syndrome de DiGeorge. Comme illustré en exemple 2 ci-dessous, les

25 paires d'amorces composites sens et antisens (SEQ ID NO :37 ; SEQ ID NO :38), (SEQ ID NO :39 ; SEQ ID NO :40), (SEQ ID NO :41 ; SEQ ID NO :42), (SEQ ID NO :43 ; SEQ ID NO :44) et (SEQ ID NO :45 ; SEQ ID NO :46), mises en oeuvre en multiplex sur l'ADN génomique total humain, ont permis de focaliser sur une région particulière au sein de celle qui est délétée dans le cadre du

30 Syndrome de DiGeorge, et ont ainsi permis d'identifier le gène *PRODH* comme un excellent candidat pour une implication dans la schizophrénie.

Un gène non remanié peut être amplifié en multiplex à titre de témoin ou d'étalon. Par exemple, lorsque l'on vise un chromosome particulier tel que le chromosome 22, on peut choisir une cible sur un autre chromosome, par exemple une cible sur le chromosome 2, telle qu'un court fragment exonique situé dans le gène *MSH2* (par exemple, à l'aide du segment d'hybridation sens de SEQ ID NO :5 et du segment d'hybridation antisens = SEQ ID NO :6, qui peuvent être respectivement couplés aux rallonges de SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2, formant ainsi les amorces composites sens et antisens de séquences respectives SEQ ID NO :17 et SEQ ID NO :18).

10

Des amorces composites selon l'invention peuvent donc par exemple comprendre, à titre de segment d'hybridation associé à la rallonge de SEQ ID NO :1 ou de séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47), une séquence choisie parmi le groupe constitué par les séquences de SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :33, SEQ ID NO :35 (groupe des amorces composites sens des exemples 1 et 2 présentés ci-dessous).

15

Les amorces composites qui comprennent la séquence de SEQ ID NO :2 ou la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48) comme rallonge, peuvent par exemple comprendre, à titre d'amorce d'amplification, une séquence choisie parmi le groupe constitué par les séquences de SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :30, SEQ ID NO :32, SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :36 (groupe des amorces composites antisens des exemples 1 et 2 présentés ci-dessous).

20

25

Avantageusement, les amorces composites d'une même pluralité de paires présentent chacune un segment d'hybridation dont la température de fusion  $T_m$  est comprise entre 50 et 65°C, préférentiellement entre 58 et 62°C, toutes bornes incluses. Très préférentiellement, les amorces composites d'une même pluralité de paires présentent chacune une température de fusion  $T_m$  supérieure à 65°C, préférentiellement comprise entre 68°C et 72°C, toutes bornes incluses.

30



Les rallonges selon l'invention peuvent être utilisées sans marquage, en mettant en œuvre d'autres moyens, connus par l'homme de l'art et capables de révéler et mesurer les produits de la PCR (par exemple, analyse par spectrographie de masse de type MALDI-TOF).

- 5 Toutefois, pour faciliter l'étape de mesure quantitative des produits amplifiés, les rallonges selon l'invention peuvent en outre porter un ou plusieurs composés non oligonucléotidiques, tels qu'un marqueur qui permet la détection quantitative de produits nucléotidiques, par exemple un composé chimioluminescent, un composé radioactif, un fluorophore, une biotine. De préférence, ce marqueur est une
- 10 fluorescéine telle que 6-FAM (commercialisée par exemple par la société Applied-Biosystems).

- Une pluralité de paires d'amorces composites conforme à l'invention comprend au moins deux paires d'amorces composites, et il n'y a pas de limite supérieure
- 15 universelle qui serait applicable au nombre de paires qui peuvent faire partie d'une même pluralité tout en restant quantitatif. Les inventeurs ont néanmoins pu constater que, grâce à la présente invention, l'on peut amplifier simultanément plus de dix cibles, par exemple de 2 à 15 séquences nucléotidiques cibles en multiplex à partir d'un même acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques de
- 20 départ (par exemple, à partir de l'ADN génomique total d'un humain), tout en restant quantitatif.

Pour produire une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'invention, on peut suivre un procédé qui comprend les étapes suivantes :

25

a) l'on sélectionne parmi :

- des paires de segments d'hybridation sens et antisens qui chacune forment une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, et

30

- des rallonges nucléotidiques qui sont absentes dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou qui à tout le moins n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois

inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille,

5 une pluralité de paires de segments d'hybridation sens et antisens qui couvre la pluralité de séquences nucléotidiques cibles visée, et une paire de rallonges nucléotidiques, dont les séquences respectives sont telles que :

10 lorsque l'une des deux rallonges sélectionnées est liée à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens sélectionné, et que l'autre des deux rallonges sélectionnées est liée à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens sélectionné, alors :

- chaque amorce composite sens ou antisens résultante a une température  
15  $T_m$  de fusion d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation nu sans rallonge, et

- chaque amorce composite sens ou antisens résultante a une séquence telle qu'elle ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite  
20 résultante, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet appariement serait supérieure à 14 kcal/mol,

b) on produit la pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens qui résulte de la sélection de la pluralité de paires de segments d'hybridation et de  
25 la paire de rallonges faite à l'étape a), et de l'adjonction de la séquence d'une des deux rallonges sélectionnées à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens de la pluralité sélectionnée, et de l'adjonction de la séquence de l'autre des deux rallonges sélectionnées à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens de la pluralité sélectionnée.

30

Pour produire une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention, on peut également suivre un procédé qui comprend les étapes suivantes :

a) l'on sélectionne une pluralité de paires de segments d'hybridation sens

et antisens :

- au sein de laquelle chaque paire de segments constitue une paire d'amorces sens et antisens pour chacune des séquences nucléotidiques cibles visées, et
- au sein de laquelle aucun segment ne peut former avec lui-même ou avec un autre segment de cette pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol, préférentiellement 13 kcal/mol, plus préférentiellement 12 kcal/mol,

b) on sélectionne deux rallonges nucléotidiques :

- dont les séquences respectives sont absentes dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins qui n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et

- qui ont des séquences respectives telles que leur adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chacun des segments d'hybridation sens sélectionnés à l'étape a), et pour l'autre à l'extrémité 5' de chacun des segments d'hybridation antisens sélectionnés à l'étape a), ne conduit pas à un ensemble d'amorces composites sens et antisens au sein duquel une amorce composite serait capable de former avec elle-même ou avec une autre amorce composite de cet ensemble un appariement complet ou partiel de bases à la formation duquel correspondrait une variation d'énergie libre  $\Delta G$  supérieure à 14 kcal/mol,

25

- c) l'on produit une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens en ajoutant la séquence de l'une des deux rallonges sélectionnées à l'étape b) à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens sélectionné à l'étape a), et en ajoutant la séquence de l'autre des deux rallonges sélectionnées à l'étape b) à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens sélectionné à l'étape a), ce qui constitue une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention.

30

Préférentiellement, lesdits segments d'hybridation, qu'ils soient sens ou antisens, ont chacun (en l'absence de rallonge) une température de fusion  $T_m$  comprise entre 50 et 65°C (bornes incluses).

- 5 La présente demande de brevet vise ainsi toute pluralité de paires d'amorces composites susceptible d'être obtenue par un procédé de production de pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention.
- La présente demande de brevet vise également, individuellement en tant que produit, toute paire d'amorces composites sens et antisens qui est choisie au sein
- 10 d'une telle pluralité.

A la connaissance de la Demanderesse, aucune rallonge de l'art antérieur n'avait été construite de manière à ce qu'elle limite la formation d'appariements stables intra- et inter-moléculaires lors de la PCR multiplex.

- 15 Or, les nouvelles rallonges selon l'invention ainsi que les amorces composites qui les contiennent sont précisément choisies de manière à éviter la formation de telles interactions, et il est ici démontré que de telles rallonges, lorsqu'elles sont utilisées dans les conditions opératoires nouvelles définies pour cette invention, permettent d'accéder à un niveau quantitatif de précision lors de l'amplification
- 20 simultanée d'un grand nombre de cibles nucléotidiques, les performances quantitatives restant optimales même au-delà de dix cibles simultanément amplifiées.

- Une manière commode et efficace de sélectionner des rallonges qui
- 25 n'augmenteront pas de manière significative le  $\Delta G$  des segments sélectionnés pour la production d'amorces composites conformes à l'invention, et qui, en outre, seront utilisables en adjonction avec une très large gamme de segments d'hybridation est de suivre le procédé de production de paires de rallonges dites universelles qui suit. Ce procédé pour produire une paire de rallonges dites
- 30 universelles comprend les étapes suivantes :

a) l'on choisit au moins 30 paires de segments d'hybridation sens et antisens :

- qui forment chacune une paire d'amorces sens et antisens pour une cible nucléotidique, de manière à viser au moins 30 cibles nucléotidiques différentes sur ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, et en veillant à ce que ces au moins 30 cibles présentent une distribution uniforme sur toute la longueur dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins dans la(les) région(s) dans laquelle(lesquelles) se trouvent les séquences nucléotidiques cibles dont l'amplification en multiplex est recherchée, et
  - dont chaque segment présente une température de fusion  $T_m$  comprise entre 50 et 65°C (bornes incluses),
- 10 constituant ainsi un ensemble de couples de segments sens et antisens tests,

- b) pour chaque couple de segments tests de l'ensemble, on détermine la valeur maximale de variation d'énergie libre  $\Delta G$  que ce couple peut présenter, par appariement partiel ou complet de bases de chacun des deux segments avec lui-même ou avec l'autre segment du même couple,
- 15

- c) on sélectionne deux rallonges de séquences différentes :
- qui ne sont pas présentes dans ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins qui n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et
  - dont l'adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chaque segment sens test, et pour l'autre à l'extrémité 5' de chaque segment antisens test, conduit à une augmentation d'une valeur comprise entre 10 et 15°C (bornes incluses) de la température de fusion  $T_m$  de chacun des segments tests, et
  - dont l'adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chaque segment sens test, et pour l'autre à l'extrémité 5' de chaque segment antisens test, ne conduit, pour aucun des couples de segments sens et antisens tests à une augmentation de plus de 3 kcal/mol de ladite valeur maximale  $\Delta G$  déterminée pour chaque couple test à l'étape b),
- 20
- 25
- 30

- d) on produit les deux rallonges sélectionnées.

L'ensemble d'au moins 30 cibles nucléotidiques doit être choisi de manière à être représentatif de la(les) région(s) dans laquelle(lesquelles) se trouvent les séquences nucléotidiques cibles dont l'amplification en multiplex est recherchée. On choisit donc un ensemble d'au moins 30 cibles nucléotidiques dont la

5 répartition est uniforme, au sens statistique du terme. Aucune limite supérieure en nombre de cibles nucléotidiques tests ne s'impose ; toutefois, un nombre compris entre 30 et 60 est généralement suffisant.

Préférentiellement, cet ensemble d'au moins 30 cibles nucléotidiques est représentatif de l'acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques sur lequel

10 l'amplification multiplex va être réalisée. Dans ce cas, on obtient en effet une paire de rallonges qui est conforme à la présente invention, et qui en outre constitue une paire de rallonges universelles pour l'organisme ou le microorganisme dont est issu l'acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques. Une telle paire de rallonges a par exemple été obtenue pour l'espèce humaine

15 (SEQ ID N°1 et SEQ N°2, ainsi que leurs complémentaires SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48). Ces rallonges peuvent donc, conformément à la présente invention, être associées à n'importe quels segments dont la cible se situe sur le génome humain : les amorces composites résultantes présenteront toujours la qualité de permettre une amplification multiplex quantitative.

20 La présente demande de brevet vise ainsi toute paire de rallonges nucléotidiques qui est susceptible d'être obtenue par ce procédé.

Lorsque l'on dispose d'une telle paire de rallonges, on peut alors (chimiquement ou virtuellement) les ajouter à des segments d'hybridation sélectionnés

25 conformément à l'invention, c'est-à-dire qui ne forment avec eux-mêmes ou entre eux aucun appariement stable (pas de  $\Delta G$  supérieur à 14 kcal/mol), en ajoutant l'une des deux rallonges à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens de la pluralité de paires qui est destinée à être mise en œuvre dans une multiplex, et l'autre des deux rallonges à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation

30 antisens de cette pluralité. Les amorces composites sens et antisens résultantes, dans pratiquement tous les cas, ne formeront entre elles aucun appariement complet ou partiel de bases dont le  $\Delta G$  serait supérieur à 14 kcal/mol. D'ailleurs, la plupart ne formeront aucun appariement complet ou partiel de bases dont le  $\Delta G$

serait supérieur à 12 kcal/mol. Si toutefois, par exception, le couplage d'un segment à l'une des deux rallonges sélectionnées conduisaient à dépasser le seuil maximal de 14 kcal/mol, alors il suffirait d'écarter le segment d'hybridation en question, pour en choisir un autre qui présente les mêmes fonctions que celui écarté, mais qui ne conduit pas à un dépassement dudit seuil de 14 kcal/mol après couplage avec la rallonge qui lui est destinée.

Des paires de rallonges selon l'invention, qui présentent le caractère dit d'universalité pour l'espèce humaine, sont notamment illustrées par les paires de rallonges choisies parmi le groupe de paires de rallonges de séquences respectives :

- les séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2,
- la séquence SEQ ID NO :1 et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48),
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence SEQ ID NO :2,
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48).

La présente demande de brevet vise également, individuellement en tant que produit, toute rallonge nucléotidique, qui est choisie parmi une telle paire de rallonges.

Une telle rallonge selon l'invention peut communément être constituée de 8 à 18 nucléotides, préférentiellement de 8 à 15 nucléotides, plus préférentiellement 8 à 14 nucléotides, encore plus préférentiellement 9 à 12 nucléotides, très préférentiellement 10 nucléotides.

Sont ainsi plus particulièrement visées les rallonges « universelles » qui sont absentes du génome humain, ou à tout le moins qui n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois) à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille.

Les inventeurs ont en effet pu mettre au point des rallonges de cette taille qui présentent la propriété dite d'« universalité » pour le génome humain, en ce sens qu'elles ont été construites par rapport à la séquence consensus du génome de

l'espèce humaine (génomme humain disponible sur le site NCBI précité), et qu'elles sont de ce fait adaptées à l'amplification multiplex quantitative de toute cible contenue dans un ADN génomique humain. La présente demande de brevet vise plus particulièrement toute rallonge dont la séquence est SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, ou la séquence (de 10 nucléotides) complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47), la séquence (de 10 nucléotides) complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48).

La présente invention propose en outre un ensemble de rallonges qui conviennent à une utilisation comme rallonge dans les amorces composites sens ou dans les amorces composites antisens d'une pluralité selon l'invention. Ces rallonges sont :

- chacune constituées de 10 nucléotides,
- présentent chacune une teneur en GC comprise entre 20% et 60% (bornes incluses, préférentiellement entre 20% et 50% (bornes incluses), plus préférentiellement entre 35 et 45%, très préférentiellement une teneur en GC de 40%, et
- sont absentes dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou n'y sont tout au plus présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure (préférentiellement au moins dix fois inférieure) à celle statistiquement prévue pour une séquence aléatoire de la même taille.

On préférera les rallonges dont la séquence est telle que l'appariement complet avec l'enchaînement de 10 nucléotides qui constitue son complémentaire parfait présente une énergie libre de formation  $\Delta G$  qui ne dépasse pas 11 kcal/mol. Les rallonges de séquence SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47), ou séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48) constituent des exemples de telles rallonges.

Une amorce composite sens ou antisens préférentielle selon l'invention a pour rallonge une rallonge dite « universelle » selon l'invention. Plus particulièrement, la présente demande vise toute amorce composite dont la rallonge a pour séquence une séquence choisie parmi le groupe constitué par la séquence de SEQ ID NO :1 et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (ces rallonges peuvent, par exemple, être utilisées pour toutes les amorces composites sens), et toute amorce



composite dont la rallonge a pour séquence une séquence choisie parmi le groupe constitué par la séquence de SEQ ID NO :2 ou la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (ces rallonges peuvent, par exemple, être utilisées pour toutes les amorces composites antisens).

5

Les rallonges d'amorces selon l'invention permettent de disposer d'amorces composites efficaces en terme de précision quantitative tout en restant parfaitement évolutives. Les rallonges selon l'invention peuvent ainsi être associées à tout segment d'hybridation souhaité, et être utilisées dans de nombreuses applications biologiques, et notamment pour la détection de remaniements génomiques, pour la détermination des bornes d'un remaniement génomique, et pour l'identification d'un gène impliqué dans une maladie génétique.

15 La présente demande de brevet vise donc, de manière générale, toute méthode pour l'amplification d'au moins une séquence nucléotidique cible présente dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, par hybridations et élongations d'au moins une paire d'amorces d'amplification, caractérisée en ce que ladite au moins une paire d'amorces est choisie parmi une pluralité de paires  
20 d'amorces composites sens et antisens selon l'invention.

Préférentiellement, lorsque un niveau quantitatif de précision est effectivement souhaité lors d'une amplification multiplex, les amorces composites sens et antisens selon l'invention contiennent des segments d'hybridation sens et antisens  
25 qui présentent des températures de fusion ( $T_m$ ) qui diffèrent de moins de 5°C. Par exemple, les segments d'hybridation sens et antisens respectivement contenus dans une paire d'amorces composites sens et antisens selon l'invention peuvent présenter chacun une  $T_m$  compris entre 50 et 65°C. Une fois associée à une rallonge selon l'invention telle que SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 ou leurs  
30 séquences complémentaires (SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48), les amorces composites sens et antisens résultantes présenteront alors généralement chacune une  $T_m$  supérieure à 65°C, et de préférence comprise entre 68°C et 72°C, toutes bornes incluses.

La méthode d'amplification selon l'invention peut être appliquée à tout acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques dans lequel ladite (lesdites) séquence(s) nucléotidique(s) cible(s) est(sont) contenue(s). Il peut par exemple s'agir d'acide  
5 nucléique ou d'un mélange d'acides nucléiques issus de cellules ou de fluides humains, mais aussi bien de cellules ou fluides animaux non-humains (mammifères non humains en particulier), tout comme de cellules ou fluides d'origine végétale. Pour des applications diagnostiques, notamment dans le cadre de la détection de remaniements génomiques, cet acide nucléique ou mélange  
10 d'acides nucléiques est le plus souvent d'origine animale, et notamment humaine. Pour des applications d'identification génétique, cet acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques est le plus souvent d'origine animale, humaine, microbiologique ou végétale. Des exemples d'échantillons de cellules comprennent notamment, dans le domaine des applications cliniques, des  
15 échantillons de cellules sanguines, de cellules épithéliales, de cellules fœtales, des biopsies. Des exemples de fluide d'origine animale comprennent du sang, de l'urine, du fluide cérébro-spinal, et de manière générale, tout fluide qu'un organisme sain ou malade est susceptible d'exsuder ou de contenir.

En fonction des amorces choisies et de l'acide nucléique ou mélange d'acides  
20 nucléiques auquel l'amplification doit être appliquée, l'homme du métier saura ajuster les conditions opératoires appropriées. S'il est choisi de réaliser l'amplification à l'aide d'une polymérase (c'est-à-dire par PCR), des conditions de mise en œuvre comprennent par exemple :

- un milieu d'amplification comprenant, en outre des amorces :  
25       de 1,5 à 5,0 mM  $MgCl_2$ ,  
         de 10 à 100 mM KCl ou  $(NH_4)_2SO_4$  ou NaCl  
         de 10 à 100 mM Tris-HCl pH 7,5 à 9,0,  
         100  $\mu M$  à 500  $\mu M$  des quatre désoxynucléotides triphosphate (dNTPs),  
         de 25 à 100 Unités/mL de Taq polymérase (par exemple, « *Thermoprime*  
30       *Plus DNA Polymerase* » de chez ABgene®),  
- des cycles de température permettant d'alterner des périodes d'hybridations et d'élongations et de dénaturations, typiquement une période de dénaturations à

94°C pendant 5 min environ, 18 à 27 cycles de PCR réalisées suivant les caractéristiques ci-dessous, suivis par une étape d'élongations de 5 min à 72°C :

10 à 30 secondes à 94°C (dénaturations),

15 à 45 secondes à une température comprise entre 50 et 60°C

5 (hybridations),

20 à 60 secondes à 72°C (élongations).

L'homme du métier saura également, à l'aide des techniques classiques, identifier et quantifier les produits d'amplification des différents fragments amplifiés par la méthode selon l'invention. A titre indicatif, pour identifier et quantifier les  
10 produits d'amplification des différents fragments d'une PCR multiplex quantitative, des conditions classiques mises en œuvre sont par exemple :

- le marquage d'une des amorces composites de chaque paire d'amorces sur son extrémité 5' par un fluorophore,

- la séparation des produits de la PCR multiplex par électrophorèse dans un  
15 appareil de séquençage d'ADN utilisé en mode d'analyse de fragments,

- l'enregistrement du profil quantitatif de la distribution de la fluorescence suite à l'électrophorèse (appelé « électrophérogramme »),

- la superposition informatique de chacun des électrophérogrammes correspondant aux échantillons analysés sur des électrophérogrammes  
20 correspondant à des témoins normaux.

Tout moyen que l'homme du métier connaît pour l'identification et l'analyse quantitative des produits de la PCR multiplex peut être utilisé dans la mise en œuvre de la présente invention. A titre d'illustration alternative, la révélation quantitative des produits d'amplification de la PCR multiplex peut aussi être  
25 réalisée par une étape d'hybridation de l'ensemble des produits de la PCR multiplex sur une ou plusieurs puces d'ADN (ou membranes équivalentes) contenant des séquences spécifiques de chaque cible. Dans ce mode de révélation, chacun des brins fluorescents issus de l'amplification d'une des cibles sera fixé quantitativement à une position précise permettant ainsi la lecture quantitative de  
30 l'amplification du fragment correspondant, sans passer par la séparation par électrophorèse.

Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, la méthode d'amplification peut être multiplex et rester quantitative. La présente demande de brevet vise donc, selon un mode préférentiel de réalisation, toute méthode pour l'amplification simultanée d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles  
5 présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, par hybridations et élongations d'une pluralité de paires d'amorces d'amplification, caractérisée en ce que ladite pluralité de paires d'amorces d'amplification est une pluralité selon l'invention.

Comme indiqué ci-dessus, les inventeurs ont constaté qu'à partir de l'ADN  
10 génomique total humain, on peut, grâce à la présente invention, amplifier simultanément plus de dix cibles, par exemple de 2 à 15 séquences nucléotidiques cibles en multiplex tout en restant quantitatif. La limite supérieure du nombre de cibles analysables simultanément au sein d'une même PCR multiplex dépend surtout des méthodes et des moyens mis en oeuvre pour distinguer lesdites cibles  
15 après amplification et de la précision et de la finesse des prédictions informatiques des interactions entre les amorces.

Les amorces composites selon l'invention sont particulièrement bien adaptées à la mise en œuvre d'une amplification de type QMPSF (« *Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments* »). Préférentiellement, lesdites séquences  
20 nucléotidiques cibles seront, pour une amplification en multiplex quantitative, choisies comme étant de courts fragments, par exemple de 90 à 500 pb, préférentiellement de 90 à 350 pb, très préférentiellement de 90 à 300 pb.

Avantageusement, lesdites hybridations et/ou lesdites élongations seront par ailleurs effectuées en présence d'agents qui facilitent la séparation des brins  
25 d'ADN, tel que le diméthyl Sulfoxide (DMSO), le triéthylammonium acétate (TEAA), ou tout agent équivalent (cf. Varadaraj K et Skinner DM, 1994, GENE 140: 1-5 « *Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+G-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases* », et Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM, 1996, Genome Methods 6: 633-638 « *Uniform amplification of a  
30 mixture of nucleic acids with varying GC content* »).

En effet, ce mode de réalisation préférentiel (amorces composites selon l'invention + DMSO, TEAA ou autre composé équivalent) présente l'avantage de

réduire encore les interactions pendant le déroulement de la PCR que ce soit au niveau des amorces composites ou que ce soit au niveau des segments amplifiés.

Afin d'accéder à un niveau quantitatif de précision, il est en outre nécessaire de limiter le nombre des cycles d'hybridations-élongations-dénaturations de façon à garder une cinétique d'amplification exponentielle pour chacune des cibles amplifiées simultanément. Préférentiellement, lesdites hybridations-élongations-dénaturations seront donc effectuées par cycles successifs jusqu'à ce que l'amplification de ladite au moins une séquence nucléotidique cible, ou le cas échéant les amplifications desdites séquences nucléotidiques cibles ait(aient) une cinétique en phase exponentielle.

Avec les rallonges selon l'invention et en utilisant du DMSO à 10%, le nombre optimal de cycles se situe généralement entre 18 et 27 cycles, par exemple de 22 à 24 cycles successifs de dénaturations-hybridations-élongations, selon la quantité initiale de matériel nucléotidique et les conditions particulières d'amplification (cf. exemple 1 ci-dessous). Si l'on a choisi des amorces d'hybridation à températures de fusion proches, la gamme de température à tester pour déterminer la température optimale d'hybridation est par ailleurs restreinte.

Selon un autre aspect particulièrement avantageux de l'invention, toutes les amorces composites et/ou paires d'amorces composites peuvent être utilisées en concentration équimolaire.

Au final, grâce aux rallonges selon l'invention, l'homme du métier n'aura qu'un nombre réduit de combinaisons [nombre de cycles x température d'hybridation] à tester pour déterminer les conditions optimales d'amplification. Par exemple, dans le cadre de l'exemple 1 ci-dessous, la température optimale d'hybridation des amorces est, en présence de DMSO à 10%, comprise entre 50 et 52°C (bornes incluses), ce qui conduit l'homme du métier à n'avoir à tester que les neuf combinaisons [22-24 cycles x 50-52°C] pour déterminer les conditions opératoires optimales. Les amorces composites selon l'invention ont ainsi des plages de conditions optimales d'amplification qui sont étroites, et prévisibles à l'avance.

Il est à noter que la présence de rallonges d'amorces selon l'invention permet d'utiliser des conditions d'hybridation qui, au cours du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> cycle d'amplification sont à la limite de la stabilité de l'appariement de l'amorce composite sur la cible. Il en résulte un gain important en terme de spécificité.

5

En outre, les amorces composites selon l'invention préservent la précision quantitative des résultats d'amplification, même lorsqu'elles sont mises en œuvre sur un acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques qui correspond à une région chromosomique, à un chromosome complet ou même à de l'ADN

10 génomique total.

Les rallonges et amorces composites selon l'invention trouvent, du fait de leurs qualités pour la mise en œuvre d'une amplification quantitative en général, et d'une amplification quantitative multiplex en particulier, de nombreuses

15 applications d'intérêt dans les domaines biotechnologiques, médicaux et vétérinaires.

La méthode d'amplification selon l'invention, du fait de son caractère quantitatif, peut être mise en œuvre pour doser certaines cibles nucléotidiques dans un

20 échantillon. Elle peut par exemple être appliquée au dosage du nombre de copies de transgènes dans des animaux transgéniques (rongeurs, bovins, ovins, par exemple) qui sont utilisés pour la mise au point de la production de substances à intérêt bio-médical ou bio-technologique, ou destinés à cette production.

Elle peut par exemple être appliquée, dans le domaine de la biologie animale ou

25 végétale, à la détermination du nombre de copies de gènes, ou la présence/absence de certains gènes, ou les caractéristiques fines de certaines régions chromosomiques, pouvant conférer des avantages agronomiques et pouvant intervenir lors de la sélection ou du maintien de certains croisements.

30 La méthode d'amplification selon l'invention peut notamment être mise en œuvre pour détecter des remaniements génomiques. La présente demande vise ainsi toute méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement

génomique au sein d'un matériel génétique B par rapport à un matériel génétique de référence A, caractérisée en ce que :

- l'on sélectionne au moins une cible nucléotidique qui constitue un marqueur du ou des remaniement(s) recherché(s), et en ce que
  - 5       - l'on applique une méthode d'amplification selon l'invention sur ledit matériel génétique B, en mettant en œuvre pour chaque cible sélectionnée une paire d'amorces composites qui est choisie parmi une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention, et qui est adaptée à l'amplification de cette cible à partir du matériel génétique B,
  - 10       ledit matériel B étant considéré comme présentant ledit remaniement génétique, lorsque le résultat d'amplification de ladite au moins une cible marqueur, obtenu à partir du matériel B, est significativement différent de celui qui serait obtenu à partir du matériel de référence A dans des conditions comparables, et
  - 15       ledit matériel B étant considéré comme ne présentant pas ledit remaniement génétique, lorsque le résultat d'amplification de ladite au moins une cible marqueur, obtenu à partir du matériel B, n'est pas significativement différent de celui qui serait obtenu à partir du matériel de référence A dans des conditions comparables.
- Cette méthode peut être appliquée aux cas de remaniements génomiques qui sont :
- 20       en fait des remaniements géniques, mais aussi, et de manière particulièrement avantageuse, aux cas des remaniements chromosomiques. De manière remarquable, une telle méthode permet de détecter des remaniements chromosomiques qui, jusqu'alors, étaient considérés comme cryptiques (non détectables par les techniques du caryotype standard), tels que les remaniements
  - 25       sub-télomériques impliqués dans de nombreux cas de retard mental inexplicés. Pour des applications dans le domaine médical, ledit matériel génétique B comprend au moins un gène humain : il peut par exemple s'agir d'un échantillon qui contient une région chromosomique humaine, un chromosome humain complet, ou de l'ADN génomique humain total. Une telle méthode peut être par
  - 30       exemple appliquée à la détection des remaniements géniques impliqués dans des maladies à déterminisme mendélien, tels que les formes familiales de cancer du sein, le cancer colorectal non polyposique héréditaire (HNPCC), l'amyotrophie spinale infantile, ou des remaniements chromosomiques éventuellement impliqués

dans des maladies à déterminisme non-mendélien, telle que la schizophrénie ou les retards mentaux non expliqués.

La méthode selon l'invention étant capable de déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique au sein d'un matériel génétique B par rapport à un matériel génétique de référence A, constitue donc une nouvelle  
5 méthode de diagnostic de telles maladies.

Préférentiellement, conformément à la présente invention, on utilise à titre d'amorces d'amplification à associer aux rallonges selon l'invention, des amorces d'amplification qui ciblent de courts fragments nucléotidiques (de 90 à 500 pb, 10 préférentiellement de 90 à 350 pb, très préférentiellement de 90 pb à 300 pb) choisis sur différents exons représentatifs du remaniement supposé.

Par rapport aux techniques de l'art antérieur qui sont adaptées à la détection de remaniements chromosomiques, la méthode selon l'invention présente de nombreux avantages. Par exemple, avec la méthode selon l'invention, il n'est pas  
15 nécessaire de procéder à une pré-culture avant analyse (contrairement à la méthode FISH), ni de mettre en œuvre un équipement de révélation spécifique (contrairement à la CGH) : elle peut être mise en œuvre directement sur un échantillon prélevé, et ne nécessite que des moyens utilisés couramment pour la mise en œuvre de la PCR fluorescente classiques. La méthode selon l'invention est en outre très puissante en terme de sensibilité de détection, tout en étant très simple techniquement et très peu coûteuse par comparaison aux techniques de l'art antérieur. Un autre atout majeur réside dans son évolutivité : les rallonges d'amorces d'amplification selon l'invention peuvent être couplées à toute amorce  
20 d'amplification souhaitée, leur conférant ainsi l'homogénéité de cinétique souhaitables.

La méthode selon l'invention pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique est plus particulièrement adaptée à la détermination de la présence ou l'absence de remaniements génomiques qui  
25 impliquent une perte de matériel génétique à l'état hétérozygote.

Les rallonges et amorces composites selon l'invention permettent en outre de déterminer les bornes de tout remaniement génomique détecté. Pour un patient



donné, il est donc possible, grâce à la présente invention, de déterminer l'étendue exacte des remaniements que son matériel génétique présente, et d'ainsi prononcer un diagnostic bien plus précis, avec des retombées éventuelles sur le pronostic et le traitement. La présente demande vise ainsi toute méthode pour  
5 déterminer au moins une des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génomique(s) qui a(ont) été détecté(s) au sein d'un matériel génétique B par comparaison avec un matériel génétique de référence A, caractérisée en ce que :

- a) l'on choisit une région candidate à l'intérieur de laquelle ladite au moins une borne est potentiellement localisée,
- 10 b) l'on choisit, pour chaque remaniement, un jeu de cibles nucléotidiques parmi lesquelles au moins une est choisie pour constituer un marqueur de ce remaniement, la ou les autres cible(s) étant choisie(s) de part et/ou d'autre de cette cible marqueur à l'intérieur de la région candidate choisie à l'étape a) de manière à couvrir l'étendue de cette région candidate,
- 15 c) l'on applique une méthode d'amplification selon l'invention audit matériel génétique B en mettant en œuvre, pour chaque cible dudit jeu choisi, au moins une paire d'amorces composites qui est choisie parmi une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention, et qui est adaptée à l'amplification de cette cible à partir dudit matériel génétique A,
- 20 d) pour chaque cible, on mesure l'intensité d'amplification ainsi obtenue à partir dudit matériel génétique B, et on la compare à l'intensité témoin qui serait obtenue pour cette même cible dans des conditions comparables mais en appliquant ladite méthode d'amplification audit matériel génétique de référence A,
- 25 e) on détermine si, au sein du jeu de cibles choisi, au moins une cible est amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, et, si ce n'est pas le cas, on réitère les étapes a) à e) en élargissant la région candidate choisie à l'étape a),  
ladite au moins une borne du ou de chacun des remaniements au sein dudit  
30 matériel génétique B étant considérée comme se trouvant à l'intérieur d'une zone comprise entre :

- la position de la cible marqueur dudit remaniement, et

- la position de la cible qui a été amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, ou s'il y en a plusieurs, avec celle qui est la plus proche de ladite cible marqueur,

5 f) si souhaité, on affine la précision de détermination de ladite borne, en marchant progressivement à l'intérieur de la zone déterminée à l'étape d) ci-dessus, par réitération des étapes a) à f) en choisissant comme région candidate à l'étape a) la zone identifiée à l'étape e) immédiatement précédente, et en choisissant à l'étape b) un jeu de cibles nucléotidiques qui couvre cette zone identifiée à l'étape e).

10

La présente demande vise aussi toute carte de remaniements génomiques susceptible d'être obtenue par cette méthode en déterminant les bornes d'au moins un remaniement génomique, et en reportant cette(ces) borne(s) sur une carte génique ou chromosomique. Pour des applications médicales, ledit matériel

15 génétique sera d'origine humaine, ce qui permet de dresser des cartes de remaniements génomiques humains. De telles cartes entrent dans le champ de la présente demande. Tout comme pour la méthode d'amplification elle-même, les remaniements génomiques en question peuvent être géniques, tout comme chromosomiques, y compris cryptiques.

20

La méthode de détermination des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génomique(s) selon l'invention permet également de détecter, et éventuellement isoler le ou les gène(s) impliqué(s) dans une maladie génétique. La présente demande vise donc toute méthode pour l'identification, et éventuellement

25 l'isolement, d'au moins un gène impliqué dans une maladie génétique, caractérisée en ce que :

- l'on met en œuvre la méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'invention sur un matériel génétique B issu d'organismes présentant ladite maladie génétique, un matériel

30 génomique comparable mais issu d'organismes témoins servant de matériel génomique de référence A, de manière à détecter le(s) remaniement(s) présent(s) dans le matériel B par rapport au matériel A, et en ce que

- l'on identifie, et éventuellement on isole, le ou les gène(s) affecté(s) par le(s) remaniement(s) détecté(s), ce(s) gène(s) identifié(s), et éventuellement isolé(s), correspondant au(x) gène(s) susceptible(s) d'être impliqué(s) dans ladite maladie génétique.

5

Cette méthode d'identification, et éventuellement d'isolement, d'au moins un gène susceptible d'être impliqué dans une maladie génétique est d'un intérêt particulier pour le dosage et la détection (présence/absence) de gènes impliqués dans la susceptibilité génétique à développer des maladies, par exemple infectieuses, tant chez l'animal non-humain que chez l'homme.

10

La méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'un ou plusieurs remaniement(s) génomique(s) conforme à l'invention, ainsi que la méthode selon l'invention pour déterminer les bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génomique(s) donné(s), constituent donc des outils de choix pour le diagnostic d'une maladie liée à un remaniement génique ou chromosomique, pour le conseil génétique (conseil génétique pré-natal, estimation de viabilité d'un remaniement existant, estimation des risques de transmission de ce remaniement, détermination des causes et conséquences d'une maladie mendélienne constatée ou prévue, estimation des risques d'infertilité ou d'avortement spontané, détermination des moyens de prévenir, pallier, améliorer l'état clinique).

15  
20

La présente demande vise donc toute méthode pour le diagnostic d'une maladie génétique dont serait affecté un individu, ou pour l'estimation d'une propension de cet individu à développer une telle maladie, caractérisée en ce que l'on met en œuvre la méthode de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'invention, et en ce que ledit diagnostic est considéré comme positif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme forte lorsque ledit au moins un remaniement génétique est déterminé comme présent, et inversement, ledit diagnostic est considéré comme négatif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme faible lorsque ledit au moins un remaniement génomique est déterminé comme absent.

25  
30

Une telle méthode peut être mise en œuvre *in vitro*, sur un échantillon de matériel génétique représentatif de ladite maladie génétique, par exemple sur un échantillon biologique prélevé sur ledit individu, et notamment sur un humain, pour lequel on suspecte une maladie à composante génétique (par exemple sur la  
5 base d'antécédents familiaux). La détermination des bornes des éventuels remaniements génomiques détectés devrait permettre d'affiner le diagnostic, et éventuellement le pronostic vital ou pathologique, voire d'ajuster la thérapie en conséquence.

L'individu objet dudit diagnostic ou pronostic peut par exemple être un animal, tel  
10 qu'un mammifère, un ovin, un bovin, un rongeur. Avantageusement, cet animal peut être un homme.

La méthode pronostique est particulièrement appropriée lorsque, dans la famille de l'individu, il a déjà été détecté un remaniement génomique impliqué dans ladite maladie génétique. Dans ce cas, ladite propension est considérée comme  
15 faible lorsque ledit au moins un remaniement génomique est déterminé comme absent chez un individu appartenant à une famille qui porte le remaniement génomique préalablement détecté.

La présente demande vise également tout kit pour la mise en œuvre d'une  
20 méthode d'amplification selon l'invention, et/ou d'une méthode pour déterminer la présence ou de l'absence de remaniements géniques ou chromosomiques selon l'invention, et/ou d'une méthode de détermination des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) géniques ou chromosomiques selon l'invention, et/ou d'une méthode pour l'identification d'au moins un gène impliqué dans une maladie  
25 génétique selon l'invention, et/ou d'une méthode diagnostique ou pronostique selon l'invention. Un kit selon l'invention comprend au moins une paire d'amorces composites selon l'invention, et/ou au moins une amorce composite selon l'invention, et/ou au moins une rallonge selon l'invention, éventuellement associée(s) à une amorce d'amplification et/ou à un marqueur pour la détection de  
30 produits nucléotidiques. Il peut avantageusement comprendre une pluralité de paires d'amorces composites selon l'invention.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants, donnés à titre purement illustratifs : ils ne la limitent en aucune façon.

Dans ces exemples, il fait référence aux figures suivantes :

5

- la figure 1 donne une représentation schématique d'une PCR mise en œuvre à l'aide d'amorces composites selon l'invention : après deux cycles d'amplification, une néo-matrice est formée par incorporation des rallonges 5' (phase d'amorçage),

10

- les figures 2A et 2B offrent, pour six fragments correspondant aux gènes *PRODH*, *UFD1L*, *ARVCF*, *HSPOX2*, *HIRA*, *MSH2*, un comparatif du profil de fluorescence obtenu à un nombre de cycles de PCR donné (ici 22) en suivant la méthode selon l'invention (figure 2B : PCR multiplex fluorescente menée à l'aide d'amorces composites selon l'invention, et en présence de DMSO), par rapport au profil de fluorescence obtenu en suivant une méthode de l'art antérieur (figure 2A : PCR multiplex fluorescente comparable, mais menée à l'aide d'amorces classiques sans rallonge, et en l'absence de DMSO),

15

20 - les figures 3, 4, 5 et 6 présentent, à titre comparatif, des tracés semi-logarithmiques représentatifs des intensités de signal mesurées lors de l'amplification de six courts fragments fluorescents (correspondant aux gènes *PRODH*, *UFD1L*, *ARVCF*, *HSPOX2*, *HIRA*, *MSH2*) en fonction du nombre de cycles PCR (tracé 1 = *PRODH* ; tracé 2 = *MSH2* ; tracé 3 = *UFD1L* ; tracé 4 = *ARVCF* ; tracé 5 = *HSPOX2* ; tracé 6 = *TUPLE1*) :

25

- figure 3 (art antérieur) : PCR multiplex de courts fragments fluorescents menée à l'aide d'amorces classiques (= amorces sans rallonge), et en l'absence de DMSO,

30

- figure 4 (art antérieur) : PCR multiplex de courts fragments fluorescents menée à l'aide d'amorces classiques (= amorces sans rallonge), et en présence de 10% de DMSO,

- figure 5 (présente invention) : PCR multiplex de courts fragments fluorescents menée à l'aide d'amorces composites selon l'invention (= avec rallonges selon l'invention), et en l'absence de DMSO,
  - figure 6 (mode préféré de réalisation de la présente invention) : PCR multiplex de courts fragments fluorescents menée à l'aide d'amorces composites selon l'invention (= avec rallonges selon l'invention), et en présence de 10% DMSO,
- 10 - la figure 7A illustre la recherche d'un gène impliqué dans la schizophrénie et la détermination des bornes d'un remaniement chromosomique : cette figure présente la région chromosomique 22q11 (qui, dans le Syndrome de DiGeorge, subit une délétion), et montre les 22 gènes de cette région sur lesquels de courts fragments exoniques ont été choisis, puis amplifiés en multiplex conformément à l'invention, ce qui a permis de redéfinir les bornes de la délétion du Syndrome de
- 15 DiGeorge (les 16 gènes touchés par la délétion sont marqués en gras souligné),
- la figure 7B illustre la détermination des bornes d'une délétion de 350 kb chez un patient schizophrène, et l'identification d'un gène candidat pour une implication dans la schizophrénie (PRODH),
- 20 - les figures 8A, 8B et 8C illustrent des résultats de détermination de remaniements chromosomiques 22q11 qui ont été obtenus à l'aide d'une PCR multiplex conforme à l'invention :
- figure 8A : profil d'amplification de courts fragments choisis au sein de gènes d'un patient indemne de remaniement 22q11 ;
  - figure 8B : profil d'amplification de courts fragments choisis au sein de gènes d'un patient atteint du Syndrome de DiGeorge comparé à celui d'un patient indemne ;
  - figure 8C : profil d'amplification de courts fragments choisis au sein de gènes d'un patient atteint de schizophrénie comparé à celui d'un patient indemne,
- 25
- 30

- les figures 9A et 9B illustrent des résultats de détermination de remaniements chromosomiques qui ont été obtenus à l'aide d'une PCR multiplex conforme à l'invention en utilisant les cibles indiquées en Figure 7B :

- figure 9A : profil d'amplification de courts fragments choisis au sein de gènes d'un patient atteint du Syndrome de DiGeorge comparé à celui d'un patient indemne ;
- figure 9B : profil d'amplification de courts fragments choisis au sein de gènes d'un patient atteint de schizophrénie comparé à celui d'un patient indemne.

**Exemple 1 : démonstration du niveau quantitatif de précision atteint pour la la détection de remaniements chromosomiques (chromosome 22)**

Afin d'illustrer certains des avantages de la méthode selon l'invention par rapport aux méthodes qui auraient pu être antérieurement pratiquées, des expériences de PCR multiplex fluorescentes ont été menées dans des conditions comparables, mais en faisant varier deux facteurs : le type d'amorces utilisées (amorces conformes à la présente invention, ou amorces correspondant à la pratique de l'art antérieur), et la présence ou l'absence de DMSO (diméthyl sulfoxyde).

A titre illustratif, il a, dans ces expériences, été choisi de cibler les remaniements chromosomiques d'une partie du bras long du chromosome 22 qui sont impliqués dans le syndrome polymalformatif de DiGeorge.

Pour détecter ces remaniements chromosomiques, il a été choisi de cibler cinq gènes situés sur le chromosome 22 humain (gènes *PRODH*, *UFD1L*, *ARVCF*, *HSPOX2*, *HIRA*), ainsi qu'un fragment utilisé comme témoin non remanié interne à la PCR multiplex et dérivé du gène *MSH2* qui est situé sur le chromosome 2 humain. De courts fragments polynucléotidiques constituant des « mouchards moléculaires » des remaniements chromosomiques éventuels ont été sélectionnés à l'intérieur de la séquence de chacun de ces gènes. A partir de la séquence de ces courts fragments, ont été construites des amorces qui permettent de les amplifier spécifiquement (= amorces construites conformément à l'art antérieur). A ces

amorces, ont été ajoutées en 5' les rallonges selon l'invention, formant ainsi des amorces composites selon l'invention. Les deux types de jeu d'amorces (jeu classique sans rallonge, et jeu d'amorces selon l'invention avec rallonges particulières en 5') sont testés sous des conditions opératoires comparables.

5

Les PCR multiplex sont menées à partir de l'ADN génomique normal extrait du sang total prélevé sur des sujets indemnes et en amplifiant de manière simultanée les différents courts fragments spécifiques de ces six gènes (PCR multiplex). Deux conditions opératoires sont testées : présence de DMSO (10%), ou absence de DMSO.

10

#### A/ CONDITIONS OPERATOIRES DE PCR

Le volume réactionnel de 25µL de la PCR utilisée dans cet exemple est composé de la façon suivante :

15

75 mM Tris HCl pH 8,8

20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,01% Tween® 20

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

20

200 µM dNTPs (désoxyribonucléosides-triphosphate)

pour les PCR menées en présence de DMSO, on ajoute 10% de DMSO final  
toutes les amorces sont présentes à la même concentration de 0,3 µM.

25

La Taq polymérase (commercialisée sous la dénomination « *Thermoprime Plus DNA Polymerase* », ABgene®) est utilisée dans cet exemple à la dose de 1,2 unité par tube. Une unité de cette enzyme est définie comme la quantité qui incorpore dans un produit de PCR 10 nanomoles de dNTP en 30 min à 74°C.

30

La quantité initiale d'ADN est fixée à 100 ng d'ADN génomique extrait à partir de sang total en utilisant le kit « QIAamp® DNA Blood Mini Kit » de Qiagen, puis dosé précisément en utilisant le système *picogreen*® dsDNA quantitation reagent (*Molecular Probes*).

La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur de marque MJResearch PTC100 96 A/V.



Les amorces composites selon l'invention qui ont été utilisées pour l'amplification de chacun des six courts fragments de gènes (pic 1 à pic 6) sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous. Chacune de ces amorces composites est constituée (de 5' en 3') d'une rallonge selon l'invention de 10 nucléotides, et d'un segment d'hybridation. Les amorces composites sens portent en outre un marquage en 5' (ici, marquage fluorescent 6-FAM).

La séquence de la rallonge sens selon l'invention est :

10 CGT TAG ATA G (SEQ ID NO : 1 selon l'invention).

La séquence de la rallonge anti-sens selon l'invention est :

GAT AGG GTT A (SEQ ID NO : 2 selon l'invention).

Les segments d'hybridation utilisés sont :

15 - pour le court fragment du gène *PRODH* (pic 1),  
ACTCCATCTCCTTGTGCTCT (SEQ ID NO : 3) pour l'amorce sens, et  
CGCTATTCAACAAGCTCATG pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 4),

- pour le court fragment du gène *MSH2* (pic 2),  
GGTAAAACACATTCCTTTGG (SEQ ID NO : 5) pour l'amorce sens, et  
20 ATATGTGAGCTTCCATTGGT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 6),

- pour le court fragment du gène *UFDIL* (pic 3),  
ATGTTTAACAACCGCCAGCA (SEQ ID NO : 7) pour l'amorce sens, et  
TCTTCCTTTCAGATGATGCAGA pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 8),

- pour le court fragment du gène *ARVCF* (pic 4),  
25 GACATGGTGCTGTGTGTGAGC (SEQ ID NO : 9) pour l'amorce sens, et  
TCCGCCTTTAGAAGTCCAAGT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 10),

- pour le court fragment du gène *HSPOX2* (pic 5),  
TGAAGCTGTGTGGCTGAAAC (SEQ ID NO : 11) pour l'amorce sens, et  
TAGCCAGGGTGTCTCAAAGA pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 12),

30 - pour le court fragment du gène *HIRA* (pic 6),  
TACCAGTCATCGGGCAGAAC (SEQ ID NO : 13) pour l'amorce sens, et  
AATGTCAGAGGCAGGACACAG pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 14).

Les amorces composites selon l'invention ici utilisées présentent donc les séquences présentées dans le Tableau 1 ci-dessous :

pic 1 (*PRODH*) : SEQ ID NO : 15 et 16 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

5 pic 2 (*MSH2*) : SEQ ID NO : 17 et 18 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

pic 3 (*UFDIL*) : SEQ ID NO : 19 et 20 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

10 pic 4 (*ARVCF*) : SEQ ID NO : 21 et 22 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

pic 5 (*HSPDX2*) : SEQ ID NO : 23 et 24 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

pic 6 (*HIRA*) : SEQ ID NO : 25 et 26 pour les amorces composites sens et antisens respectivement.

15

L'extrémité 5' de chaque amorce sens (SEQ ID N° : 15, 17, 19, 21, 23 et 25 ) porte un marquage fluorescent (dans les exemples ici présentés, marquage 6-FAM disponible par exemple auprès de la société Applied Biosystems).

20 Les amorces classiques utilisées à titre comparatif ne comprennent aucune rallonge. Elles sont donc constituées (de 5' en 3') d'un marquage fluorescent (6-FAM) et du segment d'hybridation : SEQ ID NO : 3, 5, 7, 9, 11, 13 pour les amorces sens, et SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14 pour les amorces antisens qui leur correspondent respectivement.

Tableau 1

pic	Gène ciblé	Taille amplifiée (amorce composite)	Amorce sens marquée	Amorces anti-sens
Pic 1	PRODH	190 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGACTCCATCTCCTTGTGCTCT 3'	5' GATAGGGTTACGCTATTCAACAAGCTCATG 3'
Pic 2	MSH2	207 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGGGTAAACACACATTCCCTTTGG 3'	5' GATAGGGTTAATATGTGAGCTTCCATTGGT 3'
Pic 3	UFD1L	228 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGATGTTTAAACAACGCCAGCA 3'	5' GATAGGGTTATCTTCTTTCAGATGATGCAGA 3'
Pic 4	ARVCF	254 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGGACATGGTGTGTGTGAGC 3'	5' GATAGGGTTATCCGCCCTTTAGAAAGTCCAAAGT 3'
Pic 5	HSPOX2	270 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGTGAAAGCTGTGTGGCTGAAAC 3'	5' GATAGGGTTATAGCCAGGGTGTCTCAAAGA 3'
Pic 6	HIRA	290 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGTACCAGTCATCGGGCAGAAC 3'	5' GATAGGGTTAAATGTCAGAGGCAGGACACAG 3'

Les protocoles suivants ont été comparés.

- 5 - PCR multiplex de courts fragments fluorescents avec des amorces classiques sans DMSO (figure 3) :

Après 5 minutes de dénaturation à 94°C, 18 à 27 cycles de PCR sont réalisés suivant les caractéristiques ci-dessous, suivis par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C ;

- 10                   - 10 secondes à 94°C  
                      - 15 secondes à 54°C  
                      - 20 secondes à 72°C

- PCR multiplex de courts fragments fluorescents avec des amorces classiques + 10% DMSO (figure 4) :

15                   Après 5 minutes de dénaturation à 94°C, 18 à 27 cycles de PCR sont réalisés suivant les caractéristiques ci-dessous puis suivie par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C ;

- 20                   - 10 secondes à 94°C  
                      - 15 secondes à 50°C  
                      - 20 secondes à 72°C

- PCR multiplex de courts fragments fluorescents avec des amorces composites (rallonges 5') sans DMSO (figure 5) :

25                   Après 5 minutes de dénaturation à 94°C, 18 à 27 cycles de PCR sont réalisés suivant les caractéristiques ci-dessous puis suivie par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C ;

- 10 secondes à 94°C  
                      - 15 secondes à 54°C  
                      - 20 secondes à 72°C

30

- PCR multiplex de courts fragments fluorescents avec des amorces composites (rallonges 5') ET 10% DMSO (figure 6) :

Après 5 minutes de dénaturation à 94°C, un nombre de 18 à 27 cycles de PCR sont réalisés comme décrit ci-dessous et sont suivis par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C ;

- 10 secondes à 94°C
- 5       - 15 secondes à 50°C
- 20 secondes à 72°C.

Les intensités de fluorescence obtenues en utilisant chacun des protocoles ci-dessus décrits, pour un nombre de cycles compris entre 20 et 24, sont mesurées  
10 après séparation et analyse quantitative dans le séquenceur d'ADN 377 d'Applied Biosystems, utilisé en mode d'analyse de fragments (programme Genescan<sup>TM</sup>). Les résultats, exprimés en intensités de signal mesurées en fonction du nombre de cycles, sont traduits en échelle semi-logarithmique, afin de comparer les cinétiques d'amplification des six différents fragments. Les figures 3 à 6 illustrent  
15 ces résultats. Chaque segment d'ADN amplifié dans la PCR multiplex est représenté par des traits différents : tracé 1 = *PRODH* ; tracé 2 = *MSH2* ; tracé 3 = *UFD1L* ; tracé 4 = *ARVCF* ; tracé 5 = *HSPOX2* ; tracé 6 = *TUPLE1*.

- figure 3 (art antérieur) : amorces classiques (= amorces sans rallonge), et en l'absence de DMSO,
- 20       - figure 4 (art antérieur) : amorces classiques (= amorces sans rallonge), et en présence de 10% de DMSO,
- figure 5 (présente invention) : amorces composites selon l'invention (= avec rallonges selon l'invention), et en l'absence de DMSO,
- figure 6 (mode préféré de réalisation de la présente invention) : amorces  
25 composites selon l'invention (= avec rallonges selon l'invention), et en présence de 10% DMSO.

On peut constater que les cinétiques d'amplification des six différents fragments (exprimées en figures 3 à 6 selon une échelle semi-logarithmique) sont nettement  
30 plus homogènes en suivant la méthode selon l'invention qu'en suivant une méthode de l'art antérieur : les cinétiques obtenues avec les amorces composites selon l'invention (cf. figure 5 –sans DMSO–, et figure 6 –avec DMSO–) sont plus homogènes que celles obtenues avec les amorces classiques sans rallonge (cf.

figure 3 –sans DMSO- et figure 4 –avec DMSO-). On peut en outre apprécier le niveau particulièrement remarquable d'homogénéité atteint lorsque que l'on combine l'utilisation d'amorces composites selon l'invention et de DMSO.

- 5 Les profils de fluorescence obtenus à un nombre de cycle donné montrent eux-  
aussi que l'intensité des pics correspondant aux six fragments amplifiés (pic 1 à  
pic 6) est nettement plus homogène dans le profil qui est obtenu en utilisant les  
rallonges selon l'invention et 10% de DMSO (cf. figure 2B, profil de fluorescence  
à 22 cycles), que lorsqu'on n'utilise ni rallonge ni DMSO (cf. figure 2A, profil de  
10 fluorescence à 22 cycles).

Ces résultats démontrent que, grâce aux rallonges 5' selon l'invention, les  
amorces composites peuvent être toutes apportées à la même concentration, tout  
en conduisant à des cinétiques d'amplification homogènes, et cela quels que  
15 soient les fragments amplifiés : un niveau quantitatif de précision est donc atteint  
grâce à ces rallonges 5' sans qu'il y ait à rechercher les concentrations appropriées  
pour chacune des amorces utilisées. La fidélité quantitative est encore meilleure  
lorsque l'on combine l'utilisation d'amorces composites et celle de DMSO.

- 20 Les rallonges selon l'invention peuvent être utilisées avec tout segment  
d'hybridation, et les inventeurs ont pu constater que les performances restaient  
stables alors même qu'une douzaine de segments différents sont amplifiés en  
multiplex.

- 25 Comme illustré ci-dessous, l'utilisation combinée d'amorces composites selon  
l'invention et de DMSO présente en outre l'avantage de limiter, pour toute  
combinaison nouvelle de segments à amplifier dans la même PCR multiplex, les  
tests d'optimisation du nombre de cycles et de température (avec les rallonges  
selon l'invention et en utilisant du DMSO, le nombre optimal de cycles se situe  
30 entre 22 et 24, indépendamment des segments d'hybridation utilisées, et en  
choisissant des segments d'hybridation à  $T_m$  proches, la gamme de température à  
tester reste restreinte).

B/ OPTIMISATION POUR CHAQUE NOUVELLE PCR MULTIPLEX :

Choix du nombre de cycles et de la température d'hybridation

- Tout en gardant constantes les conditions établies ci-dessus pour la PCR qui
- 5 utilise les amorces composites et le DMSO (mode de réalisation préféré de l'invention), la mise au point pour chaque nouvelle PCR multiplex demande uniquement la réalisation de 9 tests qui visent à choisir la meilleure combinaison de température et de nombre de cycles (cf. Tableau 2 ci-dessous).
- La température optimale est en effet comprise entre 50 et 52°C, et le nombre
- 10 optimal de cycles est compris entre 22 et 24, quels que soient les segments d'hybridation utilisés.

Tableau 2 :

15

Température	Nombre de cycles		
	50°C	51°C	52°C
22	Test 1	Test 2	Test 3
23	Test 4	Test 5	Test 6
24	Test 7	Test 8	Test 9

**Exemple 2 : Détermination des bornes d'un remaniement génomique, et identification, à l'aide de la méthode PCR multiplex quantitative selon l'invention, d'un gène impliqué dans une maladie génétique**

5

**A. Matériel et méthodes :**

**1. Conditions opératoires de PCR :**

- 10 Les conditions opératoires de PCR utilisées dans cet exemple correspondent à celles décrites dans l'exemple 1, à savoir :

Le volume réactionnel de 25µL de la PCR utilisée dans cet exemple est composé de la façon suivante :

- 15 75 mM Tris HCl pH 8,8  
20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,01% Tween® 20  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 µM dNTPs (désoxyribonucléosides-triphosphate)

pour les PCR menées en présence de DMSO, on ajoute 10% de DMSO final

- 20 toutes les amorces sont présentes à la même concentration de 0,3 µM.

La Taq polymérase (commercialisée sous la dénomination « *Thermoprime Plus DNA Polymerase* », ABgene®) est utilisée dans cet exemple à la dose de 1,2 unité par tube. Une unité de cette enzyme est définie comme la quantité qui incorpore

- 25 dans un produit de PCR 10 nanomoles de dNTP en 30 min à 74°C.

La quantité initiale d'ADN est fixée à 100 ng d'ADN génomique extrait à partir de sang total en utilisant le kit « QIAamp® DNA Blood Mini Kit » de Qiagen, puis dosé précisément en utilisant le système « *picogreen®* dsDNA quantitation reagent » (Molecular Probes).

- 30 La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur de marque MJResearch PTC100 96 A/V.



2. Amorces composites pour déterminer les bornes de la délétion de la région 22q11 (Syndrome de DiGeorge) :

- Les rallonges SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 selon l'invention ont été utilisées
- 5 pour former les amorces composites sens et antisens, respectivement, ayant les segments d'hybridation suivants :
- pour le court fragment du gène *PRODH*, ACTCCATCTCCTTGTGCTCT (SEQ ID NO : 3) pour l'amorce sens, et CGCTATTCAACAAGCTCATG pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 4),
- 10 pour le court fragment du gène *MSH2*, GGTAACACATTCCTTTGG (SEQ ID NO : 5) pour l'amorce sens, et ATATGTGAGCTTCCATTGGT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 6),
- pour le court fragment du gène *UFDIL*, ATGTTTAACAACCGCCAGCA (SEQ ID NO : 7) pour l'amorce sens, et TCTTCCTTTCAGATGATGCAGA pour
- 15 l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 8),
- pour le court fragment du gène *ARVCF*, GACATGGTGCTGTGTGTGAGC (SEQ ID NO : 9) pour l'amorce sens, et TCCGCCTTTAGAAGTCCAAGT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 10),
- pour le court fragment du gène *HIRA*, TACCAGTCATCGGGCAGAAC (SEQ ID NO : 13) pour l'amorce sens, et AATGTCAGAGGCAGGACACAG pour
- 20 l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 14).

Les amorces composites selon l'invention ici utilisées présentent donc les séquences qui ont été décrites dans le Tableau 1 ci-dessus.

- 25 *PRODH* : SEQ ID NO : 15 et 16 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,
- MSH2* : SEQ ID NO : 17 et 18 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,
- UFDIL* : SEQ ID NO : 19 et 20 pour les amorces composites sens et antisens
- 30 respectivement,
- ARVCF* : SEQ ID NO : 21 et 22 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

*HIRA* : SEQ ID NO : 25 et 26 pour les amorces composites sens et antisens respectivement.

L'extrémité 5' de chaque amorce composite sens (SEQ ID N° : 15, 17, 19, 21 et 25) porte un marquage fluorescent (6-FAM disponible par exemple auprès de la société Applied Biosystems).

3. Amorces composites pour identifier un gène susceptible d'être impliqué dans la schizophrénie (PCR multiplex de la région génomique entourant le gène *PRODH*, cf. figure 7B) :

10.

Les amorces composites selon l'invention qui ont été utilisées pour l'amplification de chacun des six courts fragments de gènes sont présentées dans le tableau 3 ci dessous.

Chacune de ces amorces composites est constituée (de 5' en 3') d'une rallonge selon l'invention de 10 nucléotides, et d'un segment d'hybridation. Les amorces composites sens portent en outre un marquage (ici, marquage fluorescent 6-FAM).

La séquence de la rallonge sens selon l'invention est :

CGT TAG ATA G SEQ ID NO : 1 selon l'invention.

20 La séquence de la rallonge anti-sens selon l'invention est :

GAT AGG GTT A SEQ ID NO : 2 selon l'invention.

Les segments d'hybridation utilisés sont :

pour le court fragment du gène *PRODH*, CCCTGGTGCGATGGGGT (SEQ ID NO : 27) pour l'amorce sens, et GGCACGGCGGACAAGTAG pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 28),

pour le court fragment du gène *USP18*, AGTCGTGCTGTCCTGAACG (SEQ ID NO : 29) pour l'amorce sens, et TCTTCTTCCTTCTTTCTTCAA pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 30),

30 pour le court fragment du gène *MSH2*, GGTAACACATTCCTTTGG (SEQ ID NO : 5) pour l'amorce sens, et ATATGTGAGCTTCCATTGGT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 6),

62

pour le court fragment du gène *DGSA*, GCATCCTCCTACTCTTCTCCTGG (SEQ ID NO : 31) pour l'amorce sens, et AGCCTCCCTCAAATAGGTCT pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 32),

5 pour le court fragment du gène *DGRC6*, TGGGGCTAGGAGGTCCCT (SEQ ID NO : 33) pour l'amorce sens, et CCTCCCCTTATGAGACTATCCTA pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 34),

pour le court fragment du gène *DGCR2*, AGAGGCAGGGAATGAAGAA (SEQ ID NO : 35) pour l'amorce sens, et GGGTCACCTTGATATTCACA pour l'amorce anti-sens (SEQ ID NO : 36).

10

Les amorces composites selon l'invention ici utilisées présentent donc les séquences présentées dans le Tableau 3 ci-dessous

*PROD*H : SEQ ID NO : 37 et 38 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

15 *USP*18 : SEQ ID NO : 39 et 40 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

*MSH*2 : SEQ ID NO : 17 et 18 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

20 *DGSA* : SEQ ID NO : 41 et 42 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

*DGRC6* : SEQ ID NO : 43 et 44 pour les amorces composites sens et antisens respectivement,

*DGCR2* : SEQ ID NO : 45 et 46 pour les amorces composites sens et antisens respectivement.

25

L'extrémité 5' de chaque amorce composites sens (SEQ ID N° : 17, 37, 39, 41, 43, et 45) porte un marquage fluorescent (6-FAM disponible par exemple auprès de la société Applied Biosystems).

Tableau 3

Gène ciblé	Taille amplifiée (amorce composite)	Amorce sens marquée	Amorces anti-sens
PRODH	161 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGCCCTGGTGCGATGGGGT 3'	5' GATAGGGTTAGGCACGGCGGGACAAAGTAG 3'
USP18	180 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGAGTCGTGCTGCTCGAACG 3'	5' GATAGGGTTATCTTCTTCCCTTCTTTCTTCAA 3'
MSH2	207 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGGGTAAACACATTCCTTTGG 3'	5' GATAGGGTTAATAATGTGAGCTTCCATTGGT 3'
DGSA	243 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGGCACTCCTCCTACTCTTCTCCTGG 3'	5' GATAGGGTTAAGCCTCCCTCAAATAGGTCT 3'
DGCR6	265 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGTGGGGCTAGGAGGTCCTCT 3'	5' GATAGGGTTACCTCCCTTTATGAGACTATCCTA 3'
DGCR2	312 pb	5' 6-FAM-CGTTAGATAGAGGCGAGGAATGAAGAA 3'	5' GATAGGGTTAGGGTCACCTTGATATTCACA 3'

## B. Résultats et conclusions

Pour analyser la région chromosomique 22q11 déletée dans le syndrome de DiGeorge, de courts fragments exoniques dérivés de 22 gènes situés dans cette  
5 région (*CECR1*, *TUBA8*, *USP18*, *DGCR6*, *PRODH*, *DGCR2*, *GSCL*, *HIRA*,  
*NLVCF*, *UFD1L*, *PNUTL1*, *TBX1*, *GNB1L*, *COMT*, *ARVCF*, *RANBP1*, *ZNF74*,  
*PIK4CA*, *SNAP29*, *UBE2L3*, *VPREB1*, *BCR* ; cf. figure 7A) ont été amplifiés  
simultanément en utilisant quatre PCR multiplex selon l'invention différentes.

Chacune de ces PCR multiplex incluait 4 à 8 cibles nucléotidiques différentes de  
10 cette région et une cible nucléotidique située hors de la région soumise à  
investigation (dans l'exemple présenté dans la figure 8 : un exon du gène *MSH2*,  
situé sur le chromosome 2).

Afin de valider la reproductibilité et la spécificité de la méthode, plusieurs ADN  
d'individus témoins indemnes (région chromosomique 22q11 sans remaniement)  
15 ont été comparés sur l'ensemble des 22 cibles nucléotidiques (la figure 8A montre  
une des quatre PCR multiplex utilisées).

L'ADN d'un témoin indemne et celui d'un individu atteint du syndrome de  
DiGeorge et avec délétion observée par la technique FISH ont ensuite été  
comparés sur l'ensemble des 22 cibles nucléotidiques (la figure 8B montre le  
20 résultat obtenu avec une des quatre PCR multiplex).

Pour chaque PCR multiplex, les profils de fluorescence obtenus à partir de  
différents ADN ont été alignés par superposition des pics de fluorescence obtenus  
pour la cible nucléotidique choisie hors remaniement (dans ce cas: *MSH2*). La  
figure 8B illustre la délétion hétérozygote des gènes *PRODH*, *UFD1L*, *ARVCF* et  
25 *HIRA* représentés par la réduction des pics des cibles nucléotidiques  
correspondants. Parmi les 18 cibles nucléotidiques comprises dans les autres PCR  
multiplex, 12 avaient des pics de fluorescence de hauteur également réduite par  
rapport à celle des mêmes cibles dans les témoins non remaniés, tandis que 6  
avaient des pics de fluorescence superposables à ceux des ADN témoins non  
30 remaniés.

Ces résultats ont donc montré que la délétion hétérozygote de la région de  
DiGeorge comprend les 16 gènes représentés en italique/gras/souligné dans la  
figure 7A (*DGCR6*, *PRODH*, *DGCR2*, *GSCL*, *HIRA*, *NLVCF*, *UFD1L*, *PNUTL1*,

*TBX1*, *GNB1L*, *COMT*, *ARVCF*, *RANBP1*, *ZNF74*, *PIK4CA*, *SNAP29*), tandis que les six gènes indiqués en majuscules normales ne sont pas touchés par la délétion (*CECR1*, *TUBA8*, *USP18*, *UBE2L3*, *VPREB1*, *BCR*). A noter que les bornes de la délétion définies par la nouvelle méthode ne coïncident pas avec celle indiquées précédemment par la méthode FISH et que la définition des bornes est plus précise avec la méthode décrite dans cette invention.

La figure 7B illustre les étapes qui nous ont permis de focaliser sur une région beaucoup plus courte la recherche d'un gène impliqué dans la schizophrénie, grâce à la détection d'une délétion de 350 kilobases, chez un patient schizophrène. Cette délétion a été découverte et ses bornes ont été localisées en utilisant la méthode selon l'invention et, dans l'ordre, la PCR multiplex montrée dans la figure 8C et les deux PCR multiplex montrées dans la figure 9. A noter que dans la figure 9A, un ADN non remanié est comparé avec un ADN avec délétion de DiGeorge (voir le schéma 7A), et que dans la figure 9B un ADN non remanié est comparé avec l'ADN du patient schizophrène qui présentait une délétion autour du gène *PRODH* (voir la figure 8C).

En conclusion, chez le patient schizophrène étudié les cibles nucléotidiques correspondant aux gènes *USP18* et *DGCR2* ne sont pas touchées par la délétion, alors que les cibles correspondant aux gènes *PRODH*, *DGSA* et *DGCR6* présentent une délétion hétérozygote révélée par la diminution de 50% de l'intensité de fluorescence des pics (Figure 9B). Les caractéristiques fonctionnelles du produit du gène *PRODH* l'indiquent comme un très bon candidat pour une implication dans la schizophrénie.

L'utilisation du procédé décrit dans ce brevet permet la réalisation fiable et rapide de nombreuses PCR multiplex pouvant répondre la demande de l'homme de l'art qui consiste à caractériser de façon fiable et rapide les remaniements génomiques de toutes tailles entraînant une perte ou un gain de matériel génétique.

L'homme du métier pourra trouver de nombreuses alternatives techniques à celles illustrées et décrites dans la présente demande. De telles alternatives lui sont

connus de la littérature scientifique dans le domaine de la biologie moléculaire en général, et des amplifications de séquences nucléotidiques en particulier, et de leurs applications médicales et biotechnologiques. On pourra notamment se rapporter aux manuels de base dans le domaine, tels que Maniatis *et al.*

- 5    “*Molecular Cloning : A Laboratory Manual*”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York ; Ausubel F.M. *et al.* eds., “*Current Protocols in Molecular Biology*” ; Ehrlich H.A. ed., “*PCR Technology*”, Stockton Press, New York (1989). Le contenu de tous les documents (publications scientifiques, demandes de brevets, brevets) qui sont mentionnés dans la présente demande est incorporé
- 10   par référence.

connus de la littérature scientifique dans le domaine de la biologie moléculaire en général, et des amplifications de séquences nucléotidiques en particulier, et de leurs applications médicales et biotechnologiques. On pourra notamment se rapporter aux manuels de base dans le domaine, tels que Maniatis *et al.*

- 5 "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York ; Ausubel F.M. *et al.* eds., "*Current Protocols in Molecular Biology*" ; Ehrlich H.A. ed., "*PCR Technology*", Stockton Press, New York (1989).



## REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, selon lequel chacune desdites amorces composites sens ou antisens produite est constituée :
- 10 - d'un segment d'hybridation, respectivement sens ou antisens, qui s'apparie audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, de manière à constituer une amorce sens ou antisens pour une des séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée, et
- d'une rallonge nucléotidique qui est liée à l'extrémité 5' dudit segment
- 15 d'hybridation, mais qui ne s'apparie pas audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques,
- et éventuellement d'un composant non nucléotidique, caractérisé en ce que les amorces composites sens et antisens de ladite pluralité de paires produite présentent des séquences respectives telles que :
- 20 a) chaque amorce composite sens a, au sein de ladite pluralité, une amorce composite antisens avec laquelle elle forme une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments d'hybridation respectifs constituent, l'un par rapport à l'autre, une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, chacune desdites séquences nucléotidiques cibles de la
- 25 pluralité visée ayant ainsi une paire d'amorces composites sens et antisens qui est destinée à son amplification,
- b) toutes les amorces composites sens contiennent la même rallonge nucléotidique, et toutes les amorces composites antisens contiennent la même rallonge nucléotidique, la rallonge des amorces composites sens étant différente
- 30 de celle des amorces composites antisens,
- c) la séquence de la rallonge des amorces composites sens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue

**REVENDEICATIONS**

5 1. Procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, selon lequel on produit une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens constituées :

10 - d'un segment d'hybridation, respectivement sens ou antisens, qui s'apparie audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, de manière à constituer une amorce sens ou antisens pour une des séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée, et

- d'une rallonge nucléotidique qui est liée à l'extrémité 5' dudit segment d'hybridation, mais qui ne s'apparie pas audit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques,

15 - et éventuellement d'un composant non nucléotidique, caractérisé en ce que les amorces composites sens et antisens de ladite pluralité de paires produite présentent des séquences respectives telles que :

20 a) chaque amorce composite sens a, au sein de ladite pluralité, une amorce composite antisens avec laquelle elle forme une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments d'hybridation respectifs constituent, l'un par rapport à l'autre, une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, chacune desdites séquences nucléotidiques cibles de la pluralité visée ayant ainsi une paire d'amorces composites sens et antisens qui est destinée à son amplification,

25 b) toutes les amorces composites sens contiennent la même rallonge nucléotidique, et toutes les amorces composites antisens contiennent la même rallonge nucléotidique, la rallonge des amorces composites sens étant différente de celle des amorces composites antisens,

30 c) la séquence de la rallonge des amorces composites sens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue

statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et la séquence de la rallonge des amorces composites antisens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une

5 séquence aléatoire de la même taille,

d) la température de fusion de chaque amorce composite (qu'elle soit sens ou antisens) est d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation nu sans rallonge,

e) chaque amorce composite de ladite pluralité de paires a une séquence

10 telle qu'aucune amorce composite de ladite pluralité de paires ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite de la même pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol, ladite variation d'énergie libre  $\Delta G$  étant calculée à l'aide du logiciel

15 «Primer Premier» version 5.0 commercialisé par PREMIER Biosoft International.

2. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences

20 nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1.

3. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon la revendication

25 2, caractérisée en ce que ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques est issu de cellules de mammifères.

4. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique

30 ou mélange d'acides nucléiques est issu de cellules humaines.

5. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique

statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et la séquence de la rallonge des amorces composites antisens est absente dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins n'y est présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille,

d) la température de fusion de chaque amorce composite (qu'elle soit sens ou antisens) est d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation nu sans rallonge,

e) chaque amorce composite de ladite pluralité de paires a une séquence telle qu'aucune amorce composite de ladite pluralité de paires ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite de la même pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol.

15

2. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens spécialement adaptée à l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1.

20

3. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques est issu de cellules de mammifères.

25

4. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques est issu de cellules humaines.

30

5. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique

ou mélange d'acides nucléiques correspond à l'ADN génomique total de l'organisme ou du microorganisme dont il est issu.

6. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
5 quelconque des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que la rallonge des  
amorces composites sens, ainsi que celle des amorces composites antisens,  
comprennent chacune, indépendamment l'une de l'autre, de 8 à 18 nucléotides,  
préférentiellement de 8 à 15 nucléotides, plus préférentiellement 8 à 14  
nucléotides, encore plus préférentiellement 9 à 12 nucléotides, très  
10 préférentiellement 10 nucléotides.

7. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
quelconque des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que la séquence de la  
rallonge des amorces composites sens, ainsi que celle de la rallonge des amorces  
15 composites antisens sont chacune constituées d'un enchaînement de 10  
nucléotides dont la teneur en GC est comprise entre 20% et 60% (bornes  
incluses), préférentiellement entre 20% et 50% (bornes incluses), très  
préférentiellement une teneur en GC de 40%.

20 8. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
quelconque des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que la rallonge des  
amorces composites sens ou/et celle des amorces composites antisens est/sont  
choisie/choisies parmi le groupe constitué par la séquence de SEQ ID NO :1, la  
séquence de SEQ ID NO :2, et leurs séquences complémentaires SEQ ID NO : 47  
25 et SEQ ID NO : 48.

9. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
quelconque des revendications 2 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend au  
moins une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments  
30 d'hybridation sens et antisens respectifs ont pour séquences :

- les séquences de SEQ ID NO :3 et SEQ ID NO :4, ou
- les séquences de SEQ ID NO :7 et SEQ ID NO :8, ou
- les séquences de SEQ ID NO :9 et SEQ ID NO :10, ou

- les séquences de SEQ ID NO :11 et SEQ ID NO :12, ou
- les séquences de SEQ ID NO :13 et SEQ ID NO :14.

10. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
5 quelconque des revendications 2 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une paire d'amorces composites sens et antisens dont les segments d'hybridation sens et antisens respectifs ont pour séquences :
- SEQ ID NO :27 et SEQ ID NO :28, ou
  - SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30, ou
  - 10 - SEQ ID NO :31 et SEQ ID NO :32, ou
  - SEQ ID NO :33 et SEQ ID NO :34, ou
  - SEQ ID NO :35 et SEQ ID NO :36.
11. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une  
15 quelconque des revendications 2 à 10, caractérisée en ce que les amorces composites de ladite pluralité de paires présentent chacune un segment d'hybridation dont la température de fusion  $T_m$  est comprise entre 50 et 65°C, préférentiellement entre 58 et 62°C, toutes bornes incluses.
- 20 12. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que les amorces composites de ladite pluralité de paires présentent chacune une température de fusion  $T_m$  supérieure à 65°C, préférentiellement comprise entre 68°C et 72°C, toutes bornes incluses.
- 25 13. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 12, caractérisée en ce que ledit composant non nucléotidique est un marqueur pour la détection de produits nucléotidiques.
- 30 14. Pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend de 2 à 15 paires d'amorces composites sens et antisens.

15. Procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) l'on sélectionne parmi :

- des paires de segments d'hybridation sens et antisens qui chacune forment une paire d'amorces sens et antisens pour une desdites séquences nucléotidiques cibles, et

10 - des rallonges nucléotidiques qui sont absentes dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou qui à tout le moins n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille,

15 une pluralité de paires de segments d'hybridation sens et antisens qui couvre la pluralité de séquences nucléotidiques cibles visée, et une paire de rallonges nucléotidiques,

dont les séquences respectives sont telles que :

20 lorsque l'une des deux rallonges sélectionnées est liée à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens sélectionné, et que l'autre des deux rallonges sélectionnées est liée à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens sélectionné, alors :

25 - chaque amorce composite sens ou antisens résultante a une température  $T_m$  de fusion d'une valeur de 10 à 15°C supérieure (bornes incluses) à celle que présenterait son segment d'hybridation nu sans rallonge, et

30 - chaque amorce composite sens ou antisens résultante a une séquence telle qu'elle ne peut former avec elle-même, ou avec une autre amorce composite résultante, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet appariement serait supérieure à 14 kcal/mol,

b) on produit la pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens qui résulte de la sélection de la pluralité de paires de segments d'hybridation et de

la paire de rallonges faite à l'étape a), et de l'adjonction de la séquence d'une des deux rallonges sélectionnées à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens de la pluralité sélectionnée, et de l'adjonction de la séquence de l'autre des deux rallonges sélectionnées à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens de la pluralité sélectionnée.

16. Procédé pour produire une pluralité de paires d'amorces composites selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'on sélectionne une pluralité de paires de segments d'hybridation sens et antisens :

- au sein de laquelle chaque paire de segments constitue une paire d'amorces sens et antisens pour chacune des séquences nucléotidiques cibles visées, et

- au sein de laquelle aucun segment ne peut former avec lui-même ou avec un autre segment de cette pluralité, un appariement complet ou partiel de bases pour lequel la variation d'énergie libre  $\Delta G$  liée à la formation de cet éventuel appariement serait supérieure à 14 kcal/mol, préférentiellement 13 kcal/mol, plus préférentiellement 12 kcal/mol,

b) on sélectionne deux rallonges nucléotidiques :

- dont les séquences respectives sont absentes dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins qui n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et

- qui ont des séquences respectives telles que leur adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chacun des segments d'hybridation sens sélectionnés à l'étape a), et pour l'autre à l'extrémité 5' de chacun des segments d'hybridation antisens sélectionnés à l'étape a), ne conduit pas à un ensemble d'amorces composites sens et antisens au sein duquel une amorce composite serait capable de former avec elle-même ou avec une autre amorce composite de cet ensemble un appariement



complet ou partiel de bases à la formation duquel correspondrait une variation d'énergie libre  $\Delta G$  supérieure à 14 kcal/mol,

5 c) l'on produit une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens en ajoutant la séquence de l'une des deux rallonges sélectionnées à l'étape b) à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation sens sélectionné à l'étape a), et en ajoutant la séquence de l'autre des deux rallonges sélectionnées à l'étape b) à l'extrémité 5' de chaque segment d'hybridation antisens sélectionné à l'étape a), ce qui constitue une pluralité de paires d'amorces composites selon  
10 l'une quelconque des revendications 2 à 14.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que lesdits segments d'hybridation, qu'ils soient sens ou antisens, ont chacun (en l'absence de rallonge) une température de fusion  $T_m$  comprise entre 50 et 65°C (bornes incluses).

15

18. Pluralité de paires d'amorces composites selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 17.

20 19. Paire d'amorces composites sens et antisens convenant à une utilisation au sein d'une pluralité selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisée en ce qu'elle est choisie au sein d'une pluralité selon la revendication 18.

25 20. Procédé pour produire une paire de rallonges convenant à une utilisation comme rallonge d'amorces composites sens et rallonge d'amorces composites antisens dans une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, laquelle paire étant dite universelle, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) l'on choisit au moins 30 paires de segments d'hybridation sens et antisens :

- qui forment chacune une paire d'amorces sens et antisens pour une cible nucléotidique, de manière à viser au moins 30 cibles nucléotidiques différentes sur

- ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, et en veillant à ce que ces au moins 30 cibles présentent une distribution uniforme sur toute la longueur dudit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins dans la(les) région(s) dans laquelle(lesquelles) se trouvent les séquences nucléotidiques cibles dont l'amplification en multiplex est recherchée, et
- 5       - dont chaque segment présente une température de fusion  $T_m$  comprise entre 50 et 65°C (bornes incluses),  
constituant ainsi un ensemble de couples de segments sens et antisens tests,
- 10       b) pour chaque couple de segments tests de l'ensemble, on détermine la valeur maximale de variation d'énergie libre  $\Delta G$  que ce couple peut présenter, par appariement partiel ou complet de bases de chacun des deux segments avec lui-même ou avec l'autre segment du même couple,
- 15       c) on sélectionne deux rallonges de séquences différentes :  
- qui ne sont pas présentes dans ledit acide nucléique ou mélange d'acides nucléiques, ou à tout le moins qui n'y sont présentes qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle prévue statistiquement pour une séquence aléatoire de la même taille, et
- 20       - dont l'adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chaque segment sens test, et pour l'autre à l'extrémité 5' de chaque segment antisens test, conduit à une augmentation d'une valeur comprise entre 10 et 15°C (bornes incluses) de la température de fusion  $T_m$  de chacun des segments tests, et  
- dont l'adjonction, pour l'une à l'extrémité 5' de chaque segment sens
- 25 test, et pour l'autre à l'extrémité 5' de chaque segment antisens test, ne conduit, pour aucun des couples de segments sens et antisens tests à une augmentation de plus de 3 kcal/mol de ladite valeur maximale  $\Delta G$  déterminée pour chaque couple test à l'étape b),
- 30       d) on produit les deux rallonges sélectionnées.
21. Paire de rallonges nucléotidiques destinée à coopérer avec une pluralité de segments d'hybridation sens et antisens pour former une pluralité de paires

d'amorces composites sens ou antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, laquelle paire étant dite universelle, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 20.

5 22. Paire de rallonges nucléotidiques selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi le groupe de paires de rallonges de séquences respectives :

- les séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2,
- la séquence SEQ ID NO :1 et la séquence complémentaire de SEQ ID
- 10 NO :2 (SEQ ID NO : 48),
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence SEQ ID NO :2,
- la séquence complémentaire de SEQ ID NO :1 (SEQ ID NO : 47) et la séquence complémentaire de SEQ ID NO :2 (SEQ ID NO : 48).

15

23. Rallonge nucléotidique convenant à une utilisation comme rallonge dans les amorces composites sens ou dans les amorces composites antisens d'une pluralité selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi une paire de rallonges selon la revendication 21 ou 22.

20

24. Rallonge nucléotidique convenant à une utilisation comme rallonge dans les amorces composites sens ou dans les amorces composites antisens d'une pluralité selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, caractérisée en ce que sa séquence :

25

- est constituée de 10 nucléotides,
- présente une teneur en GC comprise entre 20% et 60% (bornes incluses, préférentiellement entre 20% et 50% (bornes incluses), très préférentiellement une teneur en GC de 40%, et

30 est tout au plus présente qu'à une fréquence au moins deux fois inférieure à celle statistiquement prévue pour une séquence aléatoire de la même taille.

25. Rallonge nucléotidique selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'en outre, sa séquence est telle que l'appariement complet avec l'enchaînement de 10 nucléotides qui constitue son complémentaire parfait présente une énergie libre de formation  $\Delta G$  qui ne dépasse pas 11 kcal/mol.

5

26. Rallonge selon l'une quelconque des revendications 24 à 25, caractérisée en ce que sa séquence est choisie parmi le groupe constitué par la séquence de SEQ ID NO :1, la séquence de SEQ ID NO :2, et leurs séquences complémentaires SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48.

10

27. Amorce composite sens ou antisens, convenant à une utilisation au sein d'une pluralité selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi une paire d'amorces selon la revendication 19, et en ce que la rallonge qu'elle contient est une rallonge selon l'une quelconque des revendications 23 à 26.

15

28. Méthode pour l'amplification en multiplex d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange d'acides nucléiques, par hybridations et élongations d'une pluralité de paires d'amorces d'amplification, caractérisée en ce que ladite pluralité de paires d'amorces d'amplification est une pluralité de paires d'amorces composites sens et antisens selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18.

20

29. Méthode d'amplification selon la revendication 28, caractérisée en ce que ladite pluralité de séquences nucléotidiques cibles amplifiées en multiplex est constituée de 2 à 15 séquences nucléotidiques cibles.

25

30. Méthode d'amplification selon la revendication 28 ou 29, caractérisée en ce que lesdites séquences nucléotidiques cibles sont constituées de 90 à 500 pb, préférentiellement de 90 à 300 pb.

30

31. Méthode pour l'amplification multiplex quantitative d'une pluralité de séquences nucléotidiques cibles présentes dans un acide nucléique ou un mélange

d'acides nucléiques, par hybridations et élongations d'une pluralité de paires d'amorces d'amplification, caractérisée en ce que l'on met en œuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 30, en effectuant lesdites hybridations et/ou élongations en présence d'un agent qui facilite la séparation des  
5 brins d'ADN, tel que le diméthyl sulfoxide (DMSO), ou le triéthylammonium acétate (TEAA).

32. Méthode d'amplification selon la revendication 31, caractérisée en ce que lesdites hybridations et élongations sont effectuées par cycles successifs  
10 d'hybridations-élongations-dénaturations jusqu'à ce que les amplifications desdites séquences nucléotidiques cibles aient une cinétique en phase exponentielle.

33. Méthode d'amplification selon l'une quelconque des revendications 31 à 32,  
15 caractérisée en ce que toutes les paires d'amorces composites sont utilisées en concentration équimolaire.

34. Méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique au sein d'un matériel génétique B par rapport à un  
20 matériel génétique de référence A, caractérisée en ce que :

- l'on sélectionne au moins une cible nucléotidique qui constitue un marqueur du ou des remaniement(s) recherché(s), et en ce que

- l'on applique la méthode d'amplification selon l'une quelconque des revendications 28 à 30, ou bien celle selon l'une quelconque des revendications  
25 31 à 33, sur ledit matériel génétique B, en mettant en œuvre pour chaque cible sélectionnée une paire d'amorces composites qui est choisie parmi une pluralité de paires d'amorces composites selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, et qui est adaptée à l'amplification de cette cible à partir du matériel génétique B,

30 ledit matériel B étant considéré comme présentant ledit remaniement génétique, lorsque le résultat d'amplification de ladite au moins une cible marqueur, obtenu à partir du matériel B, est significativement différent de celui qui serait obtenu à partir du matériel de référence A dans des conditions comparables, et

ledit matériel B étant considéré comme ne présentant pas ledit remaniement génétique, lorsque le résultat d'amplification de ladite au moins une cible marqueur, obtenu à partir du matériel B, n'est pas significativement différent de celui qui serait obtenu à partir du matériel de référence A dans des conditions comparables.

35. Méthode selon la revendication 34, caractérisée en ce que ledit au moins un remaniement génomique est un remaniement génique.

36. Méthode selon la revendication 34, caractérisée en ce que ledit au moins un remaniement génomique est un remaniement chromosomique.

37. Méthode selon l'une quelconque des revendications 34 à 36, caractérisée en ce que ledit matériel génétique B comprend au moins un gène humain.

38. Méthode pour déterminer au moins une des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génomique(s) qui a(ont) été détecté(s) au sein d'un matériel génétique B par comparaison avec un matériel génétique de référence A, caractérisée en ce que :

a) l'on choisit une région candidate à l'intérieur de laquelle ladite au moins une borne est potentiellement localisée,

b) l'on choisit, pour chaque remaniement, un jeu de cibles nucléotidiques parmi lesquelles au moins une est choisie pour constituer un marqueur de ce remaniement, la ou les autres cible(s) étant choisie(s) de part et/ou d'autre de cette cible marqueur à l'intérieur de la région candidate choisie à l'étape a) de manière à couvrir l'étendue de cette région candidate,

c) l'on applique la méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 30, ou bien la méthode selon l'une quelconque des revendications 31 à 33, audit matériel génétique B en mettant en œuvre, pour chaque cible dudit jeu choisi, au moins une paire d'amorces composites qui est choisie parmi une pluralité de paires d'amorces composites selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, et 18, et qui est adaptée à l'amplification de cette cible à partir dudit matériel génétique A,

d) pour chaque cible, on mesure l'intensité d'amplification ainsi obtenue à partir dudit matériel génétique B, et on la compare à l'intensité témoin qui serait obtenue pour cette même cible dans des conditions comparables mais en appliquant ladite méthode d'amplification audit matériel génétique de référence

5 A,

e) on détermine si, au sein du jeu de cibles choisi, au moins une cible est amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, et, si ce n'est pas le cas, on réitère les étapes a) à e) en élargissant la région candidate choisie à l'étape a),

10 ladite au moins une borne du ou de chacun des remaniements au sein dudit matériel génétique B étant considérée comme se trouvant à l'intérieur d'une zone comprise entre :

- la position de la cible marqueur dudit remaniement, et

15 - la position de la cible qui a été amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, ou s'il y en a plusieurs, avec celle qui est la plus proche de ladite cible marqueur,

f) si souhaité, on affine la précision de détermination de ladite borne, en marchant progressivement à l'intérieur de la zone déterminée à l'étape d) ci-dessus, par réitération des étapes a) à f) en choisissant comme région candidate à 20 l'étape a) la zone identifiée à l'étape e) immédiatement précédente, et en choisissant à l'étape b) un jeu de cibles nucléotidiques qui couvre cette zone identifiée à l'étape e).

39. Procédé pour fabriquer une carte de remaniements génomiques; caractérisé en 25 ce que l'on détermine les bornes d'au moins un remaniement génomique par la méthode selon la revendication 38, et en ce que l'on reporte ces bornes sur une carte génique ou chromosomique.

40. Méthode pour l'identification, et éventuellement l'isolement, d'au moins un 30 gène susceptible d'être impliqué dans une maladie génétique, caractérisée en ce que :

- l'on met en œuvre la méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des

d) pour chaque cible, on mesure l'intensité d'amplification ainsi obtenue à partir dudit matériel génétique B, et on la compare à l'intensité témoin qui serait obtenue pour cette même cible dans des conditions comparables mais en appliquant ladite méthode d'amplification audit matériel génétique de référence

5 A,

e) on détermine si, au sein du jeu de cibles choisi, au moins une cible est amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, et, si ce n'est pas le cas, on réitère les étapes a) à e) en élargissant la région candidate choisie à l'étape a),

10 ladite au moins une borne du ou de chacun des remaniements au sein dudit matériel génétique B étant considérée comme se trouvant à l'intérieur d'une zone comprise entre :

- la position de la cible marqueur dudit remaniement, et

15 - la position de la cible qui a été amplifiée avec une intensité non significativement différente de l'intensité témoin, ou s'il y en a plusieurs, avec celle qui est la plus proche de ladite cible marqueur,

f) si souhaité, on affine la précision de détermination de ladite borne, en marchant progressivement à l'intérieur de la zone déterminée à l'étape d) ci-dessus, par réitération des étapes a) à f) en choisissant comme région candidate à l'étape a) la zone identifiée à l'étape e) immédiatement précédente, et en choisissant à l'étape b) un jeu de cibles nucléotidiques qui couvre cette zone identifiée à l'étape e).

39. Méthode pour l'identification, et éventuellement l'isolement, d'au moins un gène susceptible d'être impliqué dans une maladie génétique, caractérisée en ce que :

25 - l'on met en œuvre la méthode pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des revendications 34 à 37 sur un matériel génétique B issu d'organismes présentant ladite maladie génétique, un matériel génomique comparable mais issu d'organismes témoins servant de matériel génomique de référence A, de manière à détecter le(s) remaniement(s) présent(s) dans le matériel B par rapport au matériel A, et en ce que



revendications 34 à 37 sur un matériel génétique B issu d'organismes présentant ladite maladie génétique, un matériel génomique comparable mais issu d'organismes témoins servant de matériel génomique de référence A, de manière à détecter le(s) remaniement(s) présent(s) dans le matériel B par rapport au matériel A, et en ce que

- l'on identifie, et éventuellement on isole, le ou les gène(s) affecté(s) par le(s) remaniement(s) détecté(s),

ce(s) gène(s) identifié(s), et éventuellement isolé(s), correspondant au(x) gène(s) susceptible(s) d'être impliqué(s) dans ladite maladie génétique.

10

41. Méthode pour le diagnostic d'une maladie génétique dont serait affecté un individu, ou pour l'estimation d'une propension de cet individu à développer une telle maladie, caractérisée en ce que l'on met en œuvre, sur un échantillon de matériel génétique représentatif de ladite maladie génétique, la méthode de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, et en ce que ledit diagnostic est considéré comme positif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme forte lorsque ledit au moins un remaniement génétique est déterminé comme présent, et inversement,

20 ledit diagnostic est considéré comme négatif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme faible lorsque ledit au moins un remaniement génomique est déterminé comme absent.

42. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode d'amplification selon l'une quelconque des revendications 28 à 30, et/ou d'une méthode d'amplification selon l'une quelconque des revendications 31 à 33, et/ou d'une méthode pour déterminer la présence ou de l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, et/ou d'une méthode de détermination des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génétique(s) selon la revendication 38, et/ou d'une méthode pour l'identification d'au moins un gène impliqué dans une maladie génétique selon la revendication 40, et/ou d'une méthode diagnostique ou pronostique selon la revendication 41, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une paire d'amorces composites selon la revendication

- l'on identifie, et éventuellement on isole, le ou les gène(s) affecté(s) par le(s) remaniement(s) détecté(s),  
ce(s) gène(s) identifié(s), et éventuellement isolé(s), correspondant au(x) gène(s) susceptible(s) d'être impliqué(s) dans ladite maladie génétique.

5

40. Méthode pour le diagnostic d'une maladie génétique dont serait affecté un individu, ou pour l'estimation d'une propension de cet individu à développer une telle maladie, caractérisée en ce que l'on met en œuvre, sur un échantillon de matériel génétique représentatif de ladite maladie génétique, la méthode de  
10 détermination de la présence ou de l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, et en ce que ledit diagnostic est considéré comme positif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme forte lorsque ledit au moins un remaniement génétique est déterminé comme présent, et inversement,  
15 ledit diagnostic est considéré comme négatif, ou le cas échéant, ladite propension est considérée comme faible lorsque ledit au moins un remaniement génomique est déterminé comme absent.

41. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode d'amplification selon l'une  
20 quelconque des revendications 28 à 30, et/ou d'une méthode d'amplification selon l'une quelconque des revendications 31 à 33, et/ou d'une méthode pour déterminer la présence ou de l'absence d'au moins un remaniement génomique selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, et/ou d'une méthode de détermination des bornes d'un ou plusieurs remaniement(s) génétique(s) selon la  
25 revendication 38, et/ou d'une méthode pour l'identification d'au moins un gène impliqué dans une maladie génétique selon la revendication 39, et/ou d'une méthode diagnostique ou pronostique selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une paire d'amorces composites selon la revendication 19, et/ou au moins une amorce composite selon la revendication 27, et/ou au  
30 moins une rallonge selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, éventuellement associée(s) à une amorce d'amplification et/ou à un marqueur pour la détection de produits nucléotidiques.

81

19, et/ou au moins une amorce composite selon la revendication 27, et/ou au moins une rallonge selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, éventuellement associée(s) à une amorce d'amplification et/ou à un marqueur pour la détection de produits nucléotidiques.

5

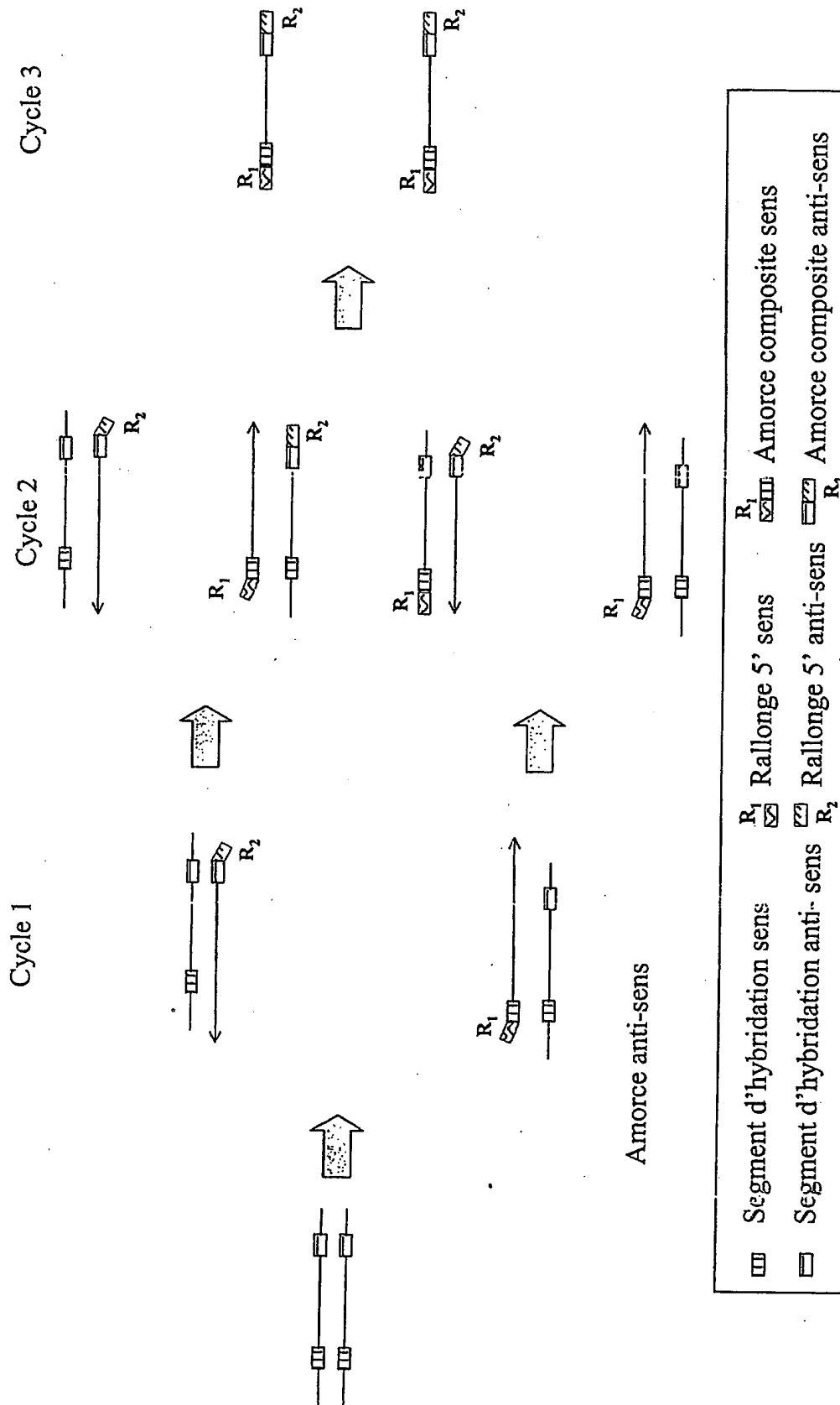


Figure 1

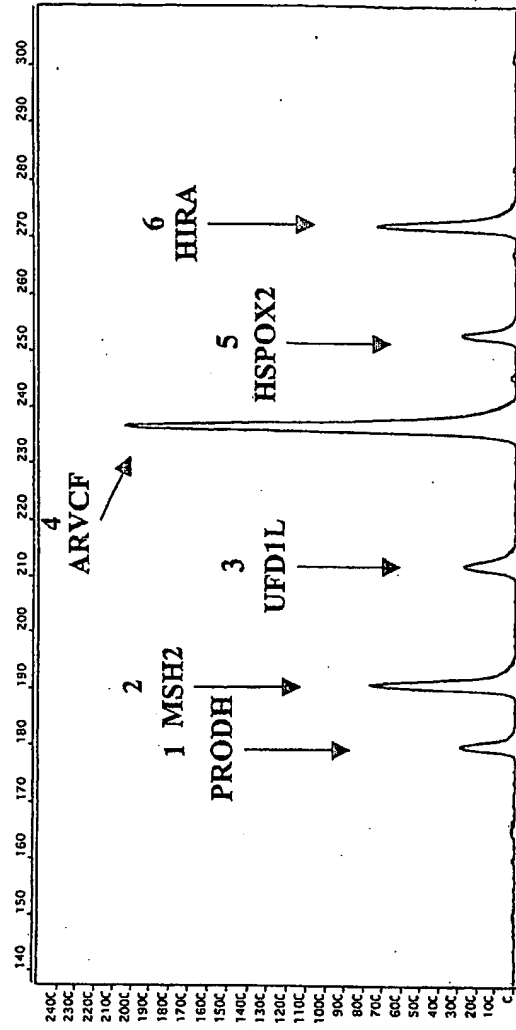


Figure 2A

PCR multiplex de courts fragments  
fluorescents avec des amorces  
classiques

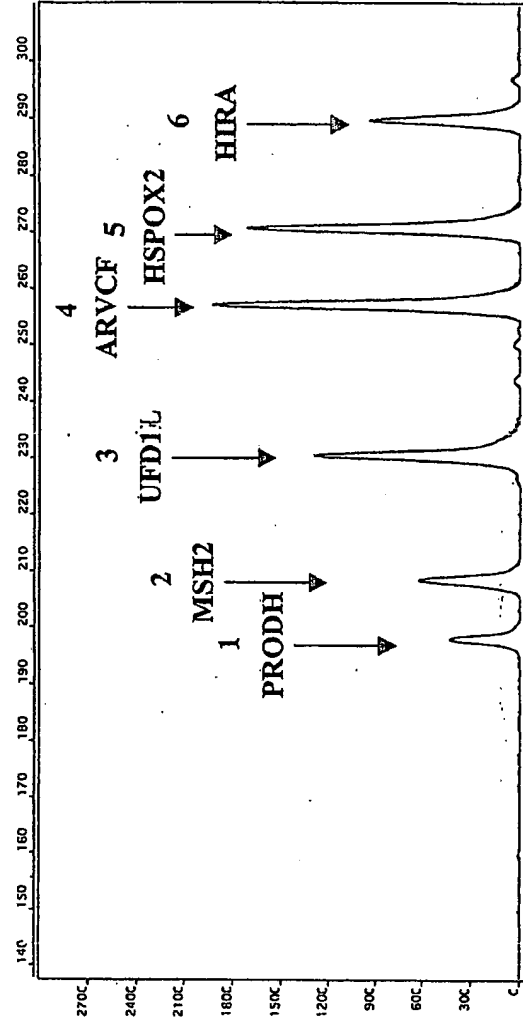
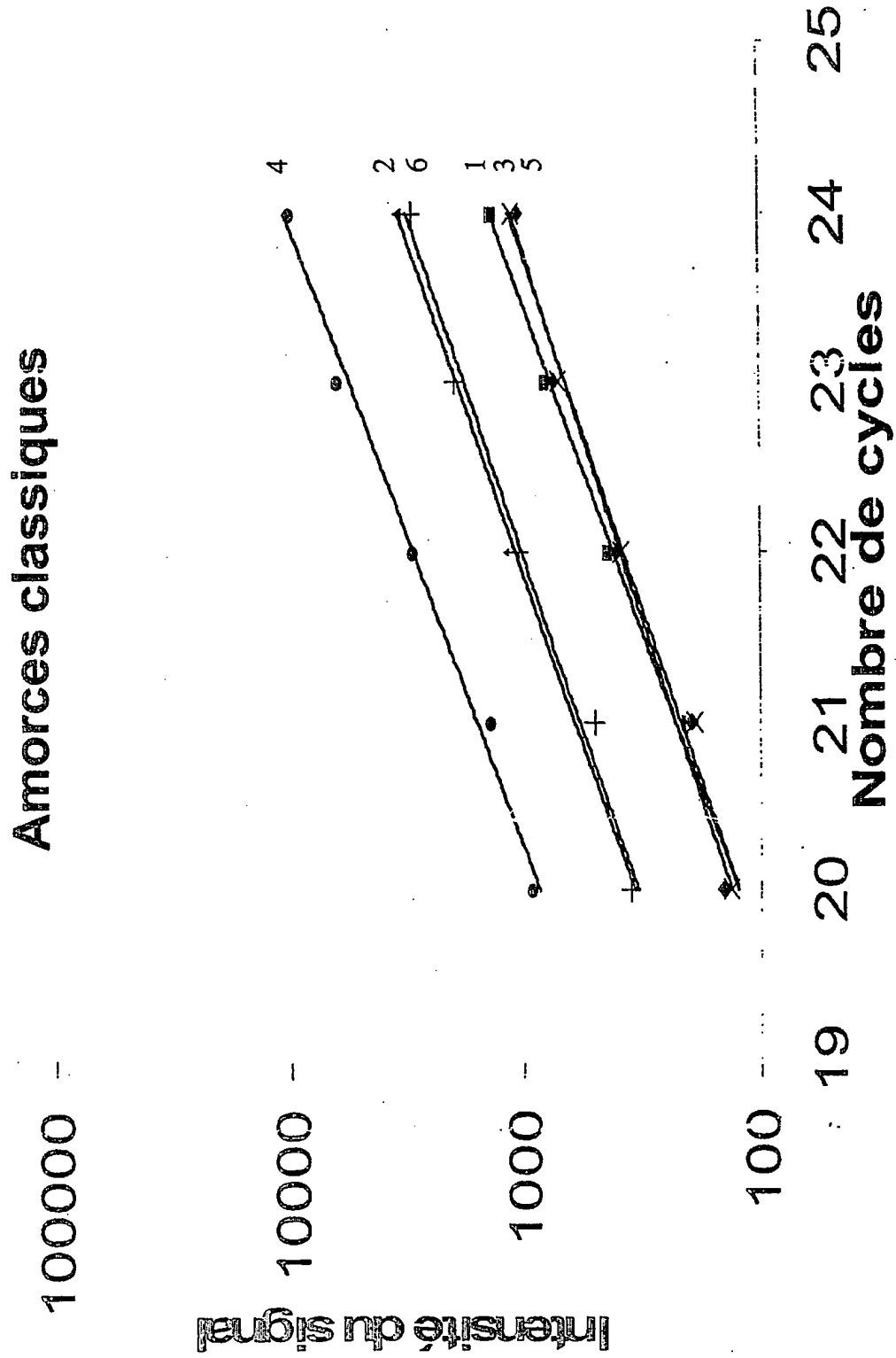


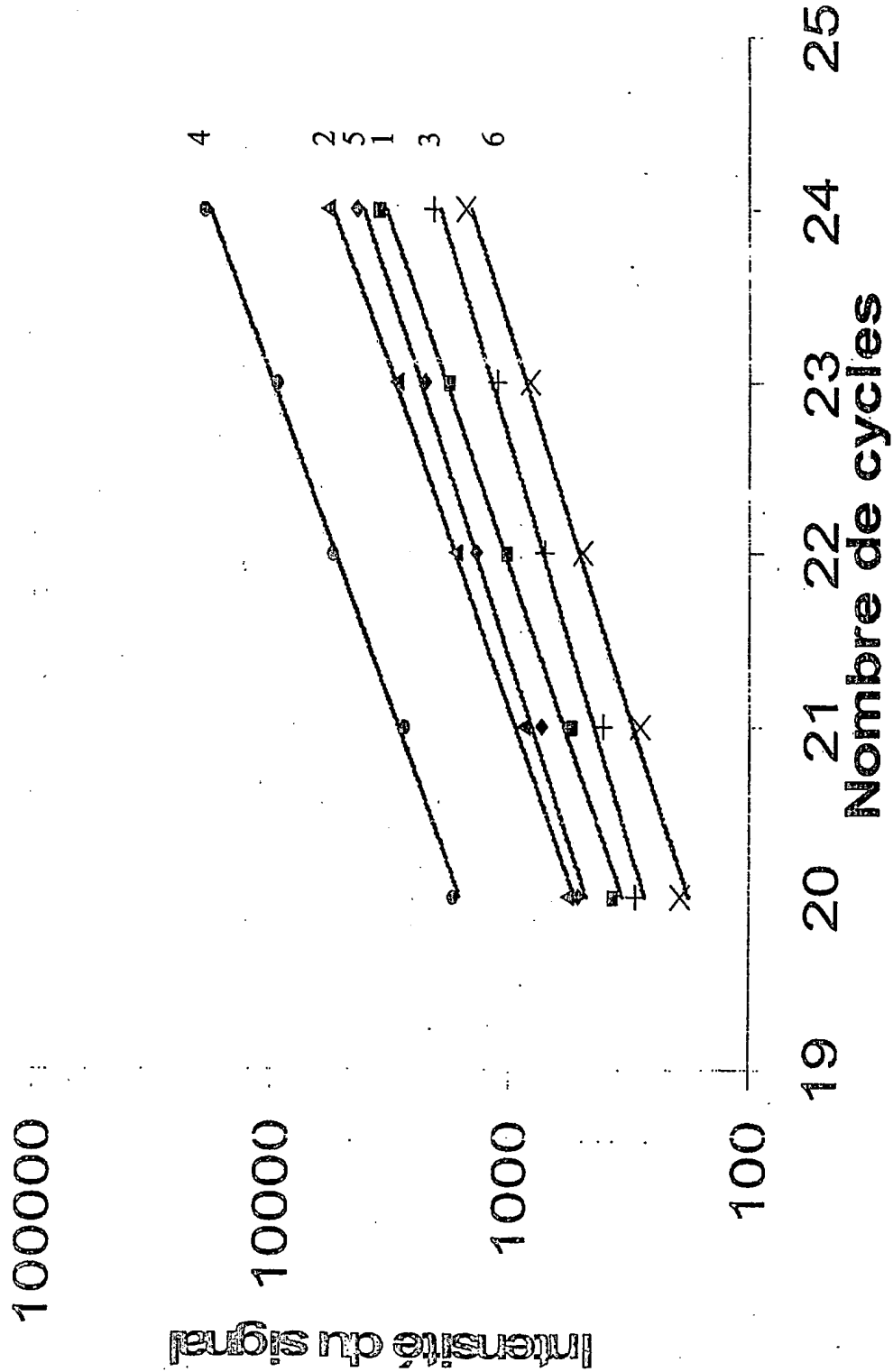
Figure 2B

PCR multiplex de courts  
fragments fluorescents avec des  
amorces composites



1: PROD1; 2: MSH2; 3: UFD1L; 4: ARVCF; 5: HSPOX2; 6: TUPLE1

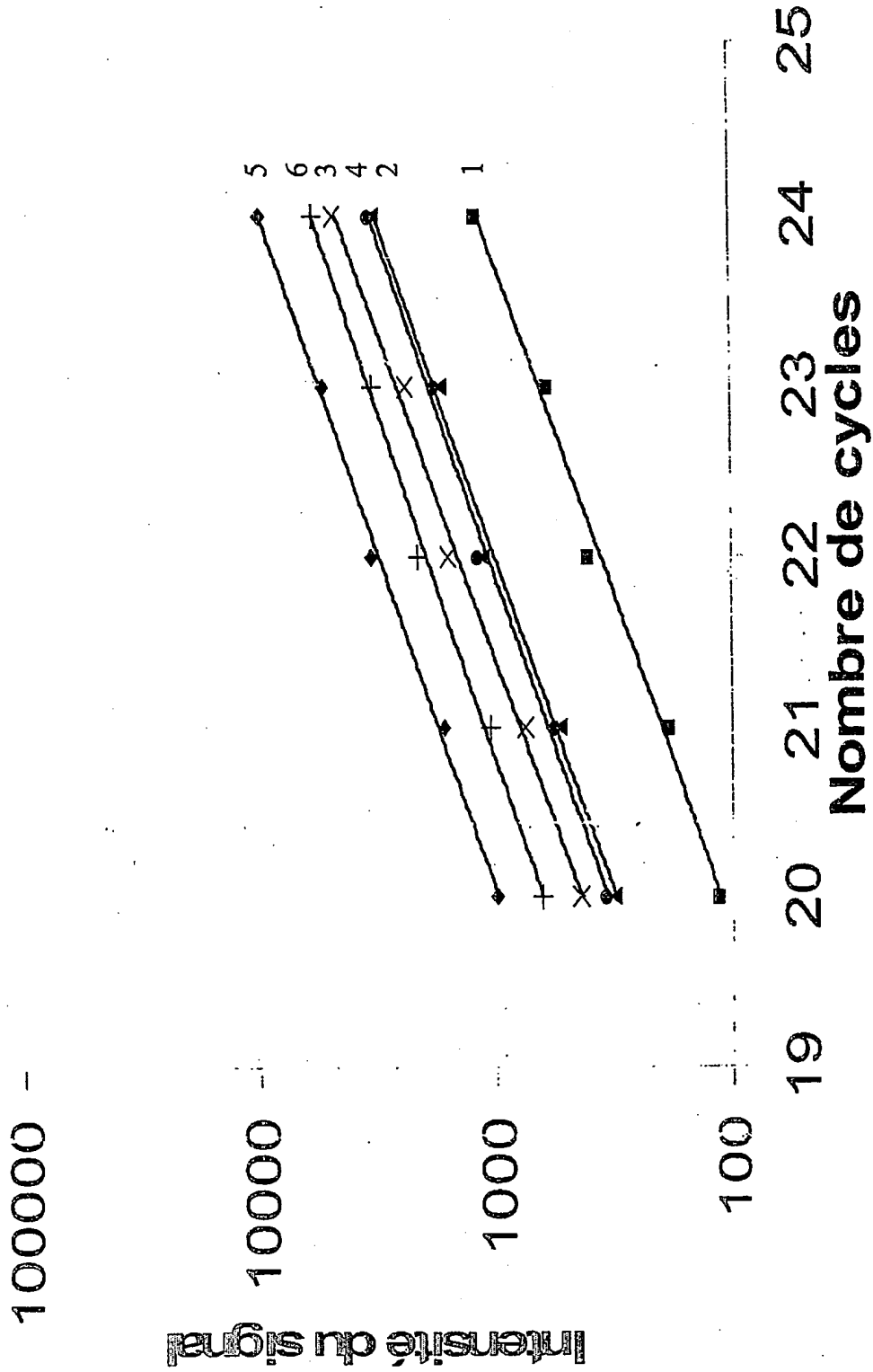
Figure 3

**amorces classiques + 10 % DMSO**

1: PROD1; 2: MSH2 ; 3: UFD1L ; 4: ARVCF ; 5: HSPX2 ; 6: TUPLE1

Figure 4

## amorces composites sans DMSO

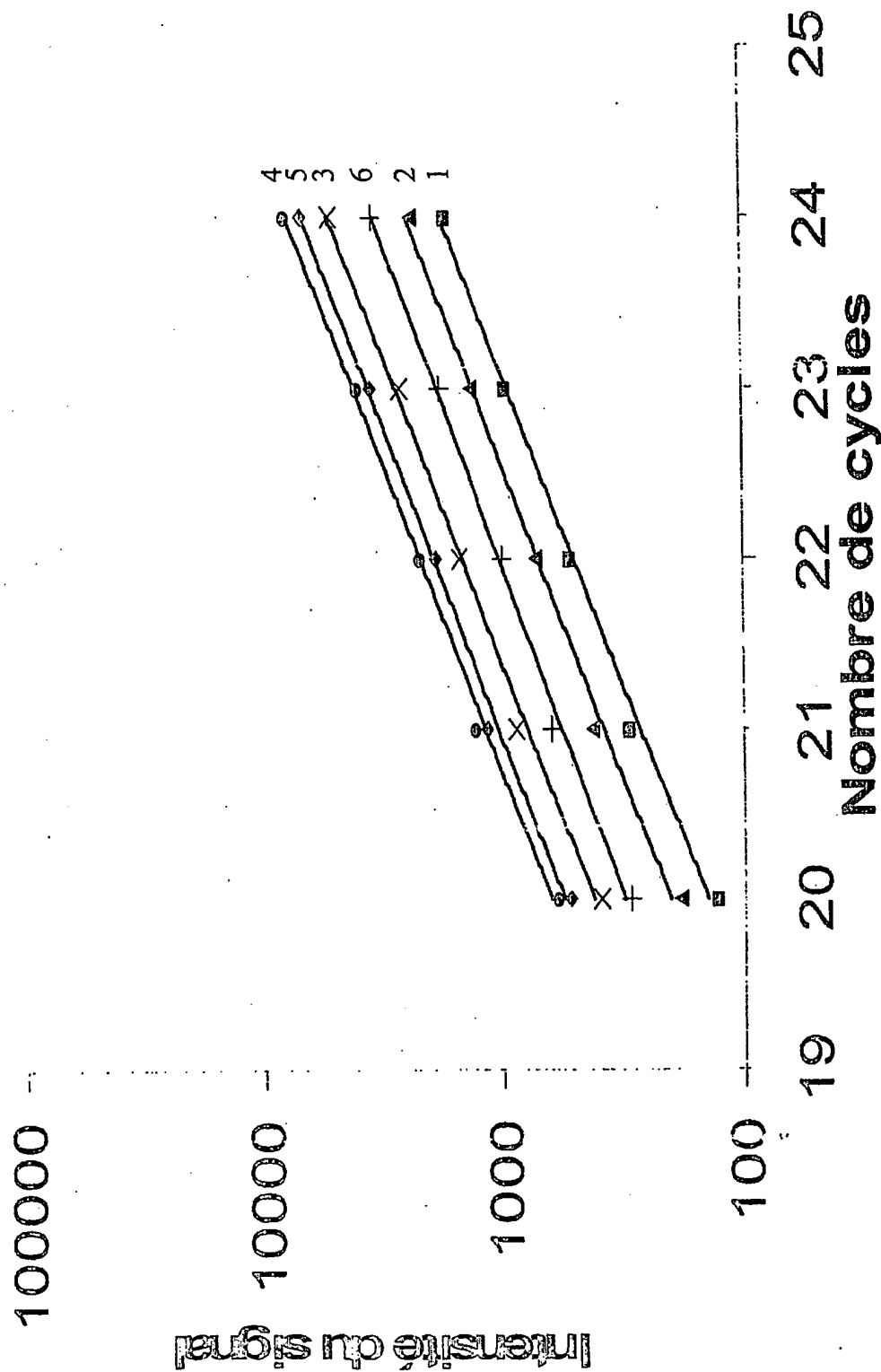


1: PROD; 2: MSH2 ; 3: UFDIL ; 4: ARVCF ; 5: HSPOX2 ; 6: TUPLEI

Figure 5



amorce composite + 10 % DMSO



1: PROD1; 2: MSH2; 3: UFD1L; 4: ARVCF; 5: HSPX2; 6: TUPLE1

Figure 6

Redéfinition des bornes de la  
délétion du syndrome de DiGeorge

Nouvelle délétion de 350 kb  
chez un patient schizophrène

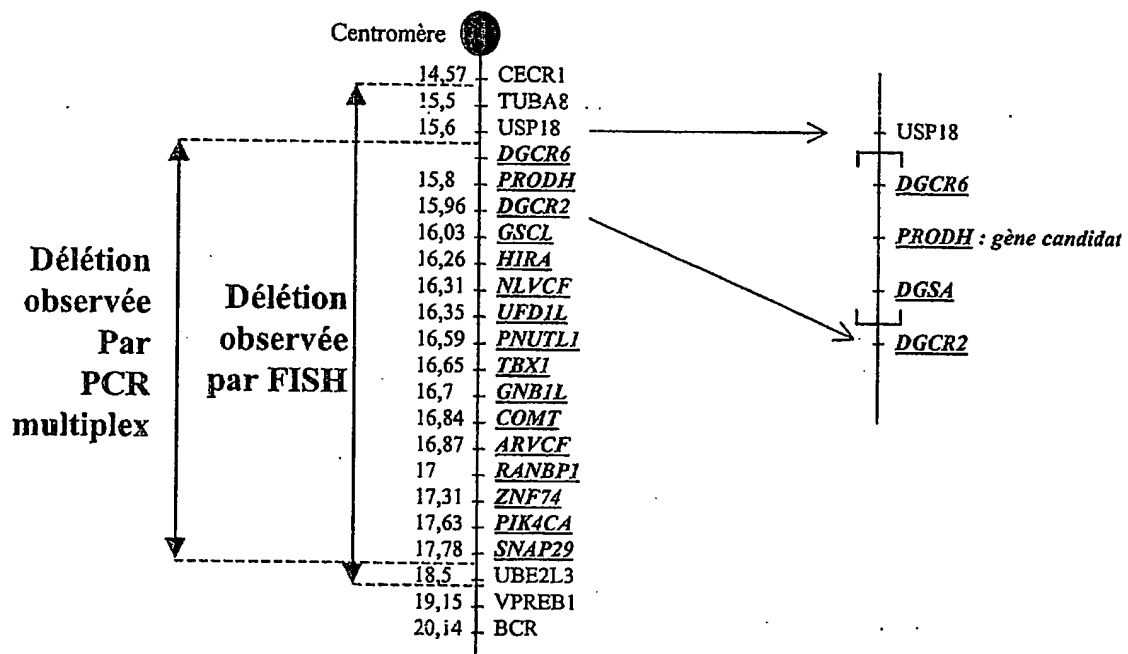


Figure 7A

Figure 7B

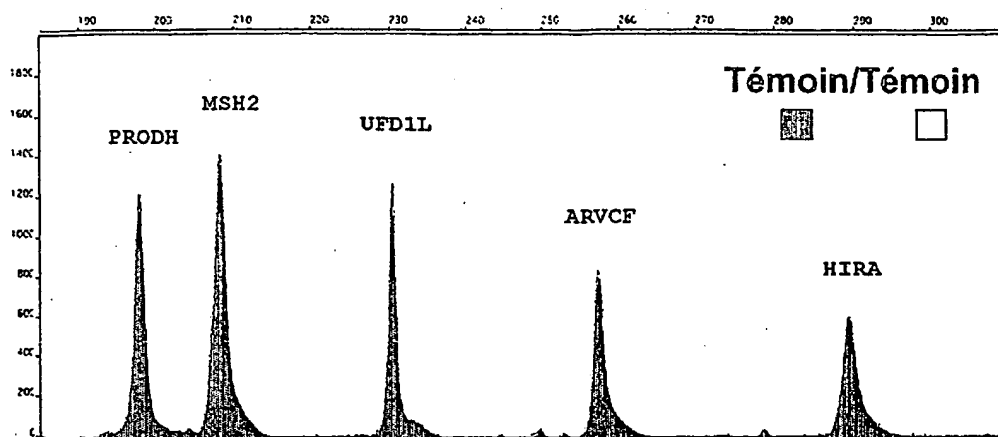


Figure 8A

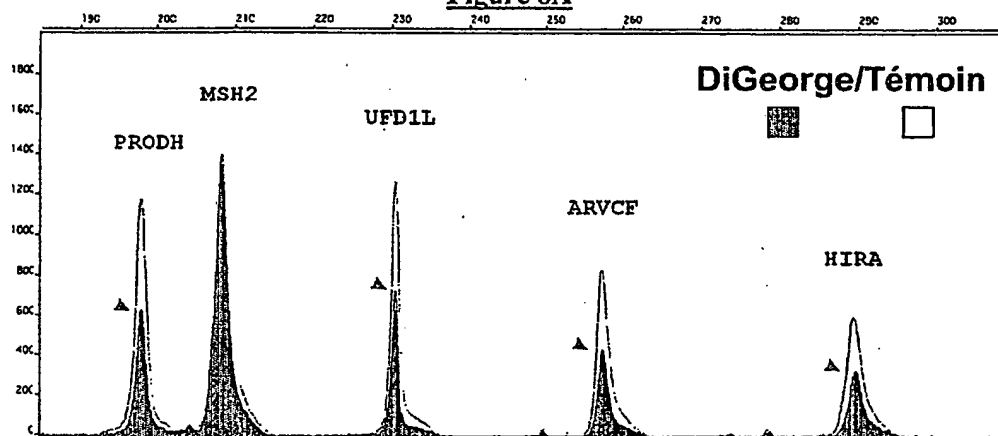


Figure 8B

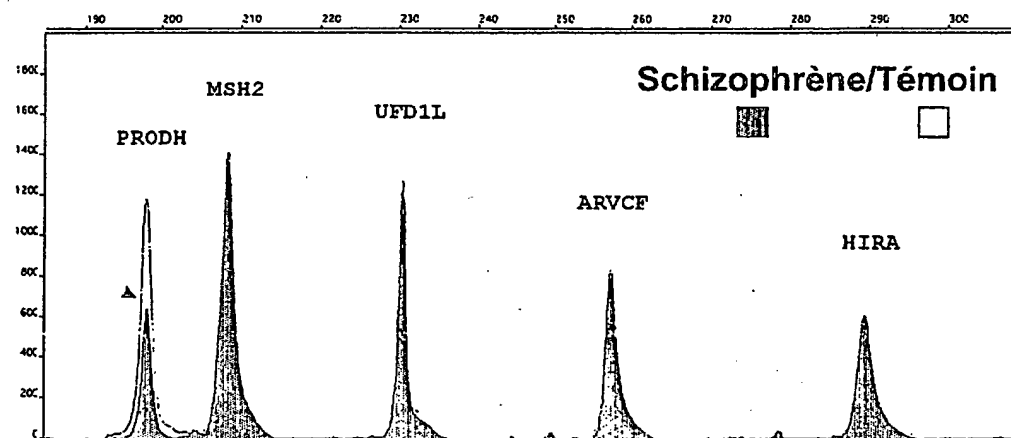
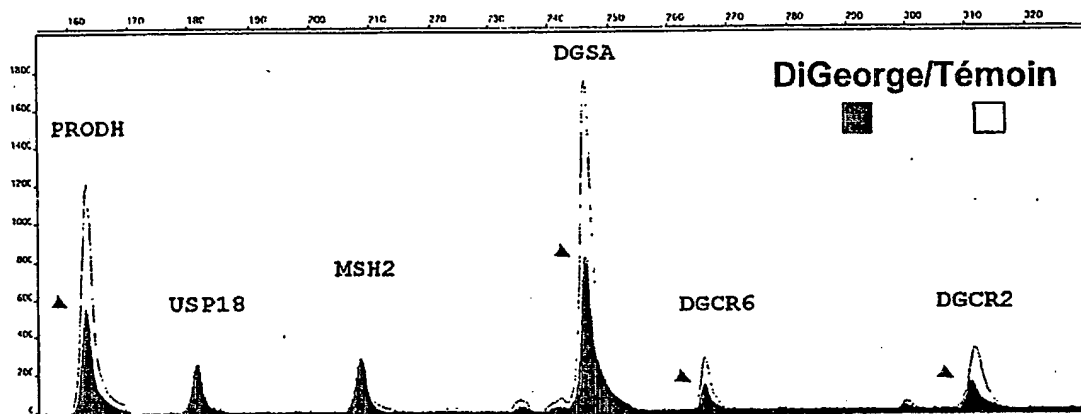
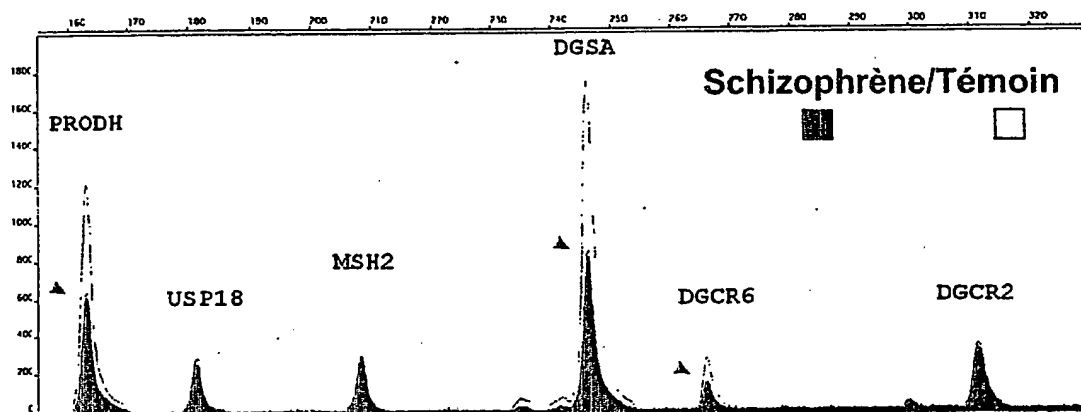


Figure 8C



**Figure 9A**



**Figure 9B**

SEQUENCE LISTING

<110> I.N.S.E.R.M.

UNIVERSITE DE ROUEN

<120> AMPLIFICATION MULTIPLEX QUANTITATIVE A L'ECHELLE D'UN GENOME, ET  
APPLICATIONS A LA DETECTION DE REMANIEMENTS GENOMIQUES

<130> FP - FREBOURG BFF020009

<160> 48

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> non-hybridizing primer tag

<400> 1  
cgttagatag

10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> non-hybridizing primer tag

<400> 2  
gatagggtta

10

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 3  
actccatctc cttgtgctct

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 4  
cgctattcaa caagctcatg

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 5  
ggtaaaacac attcctttgg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 6

atatgtgagc ttccattggt

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 7

atgtttaaca accgccagca

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 8

tcttcctttc agatgatgca ga

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 9

gacatggtgc tgtgtgtgag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 10

tccgccttta gaagtccaag t

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 11

tgaagctgtg tggctgaaac

~

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence



<220>

<223> hybridization segment

<400> 12

tagccagggt gtctcaaaga

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 13

taccagtcac cgaggcagaac

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 14

aatgtcagag gcaggacaca g

21

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 15  
cgtttagatag actccatctc cttgtgctct

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 16  
gatagggtta cgctattcaa caagctcatg

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 17  
cgtttagatag ggtaaaacac attcctttgg

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 18  
gatagggtta atatgtgagc ttccattggt

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 19

cgttagatag atgtttaaca accgccagca

30

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 20

gatagggtta tcttcctttc agatgatgca ga

32

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 21

cgttagatag gacatggtgc tgtgtgtgag c

31

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 22

gataggggta tccgccttta gaagtccaag t

31

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 23

cgttagatag tgaagctgtg tggctgaaac

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 24

gataggggta tagccagggt gtctcaaaga

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 25

cgttagatag taccagtcac cgggcagaac

30

<210> 26

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 26

gatagggtta aatgtcagag gcaggacaca g

31

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 27

ccctggtgcg atggggt

17

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

10

<400> 28  
ggcacggcgg gacaagtag

19

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 29  
agtcgtgctg tcctgaacg

19

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 30  
tcttcttctt tcttttcttc aa

22

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> hybridization segment

<400> 31  
gcatctctct actcttctcc tgg

23

11

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybridization segment

&lt;400&gt; 32

agcctccctc aaataggtct

20

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybridization segment

&lt;400&gt; 33

tggggctagg aggtccct

18

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybridization segment

&lt;400&gt; 34

cctcccttt atgagactat ccta

24

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 19

12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybridization segment

&lt;400&gt; 35

agaggcaggg aatgaagaa

19

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hybridization segment

&lt;400&gt; 36

gggtcacctt gatattcaca

20

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; composite primer

&lt;400&gt; 37

cgttagatag ccctgggtgcg atgggggt

27

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence



<220>

<223> composite primer

<400> 38

gatagggtta ggcacggcgg gacaagtag

29

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 39

cgtagatag agtcgtgctg tcctgaacg

29

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 40

gatagggtta tcttcttcct tcttttcttc aa

32

<210> 41

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

14

<400> 41  
cgtttagatag gcacccctcct actcttctcc tgg

33

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 42  
gatagggtta agcctccctc aaataggtct

30

<210> 43

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 43  
cgtttagatag tggggctagg aggtccct

28

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> composite primer

<400> 44  
gatagggtta cctccccttt atgagactat ccta

34

15

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; composite primer

&lt;400&gt; 45

cgttagatag agaggcaggg aatgaagaa

29

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; composite primer

&lt;400&gt; 46

gatagggtta gggtcacctt gatattcaca

30

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; non-hybridizing primer tag

&lt;400&gt; 47

ctatctaacg

10

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 10

16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> non-hybridizing primer tag

<400> 48  
taaccctatc

10